

**Enzymatische Methylierung von
transfer-Ribonukleinsäuren:
Hemmung und Stimulation**

Dieter Wildenauer

1973

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Enzymatische Methylierung von transfer-Ribonukleinsäuren:

Hemmung und Stimulation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Dieter Wildenauer

München 1973



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Dannenberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. D. Stachel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.1973

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München und Martinsried in der Abteilung von Herrn Professor H. Dannenberg unter der Leitung von Herrn Dr. H. J. Gross in der Zeit von Oktober 1971 bis Oktober 1973 durchgeführt.

Herrn Professor H. Dannenberg danke ich herzlich für Anregungen und die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Professor H. D. Stachel danke ich für sein Interesse, wodurch es mir ermöglicht wurde, diese Arbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie durchzuführen.

Herrn Dr. H. J. Gross bin ich besonders dankbar für die stete Hilfe, für viele Ratschläge und zahlreiche kritische Diskussionen.

Herrn Professor H. Druckrey, Freiburg, möchte ich für die Beratung bei den Tierversuchen danken.

Herrn Dr. M. Saneyoshi, Tokyo, danke ich für die Überlassung einer unveröffentlichten Vorschrift zur zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden.

Herrn Professor A. Schauer und Herrn Dr. E. Kunze vom pathologischen Institut der Universität danke ich für histologische Untersuchungen.

Herrn Dr. W. Schäfer und Frau L. Schellong danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Fräulein H. Alberty und Frau E. M. Czerny möchte ich herzlich danken für wertvolle Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Frau O. Rösing und Herrn R. Kaneder danke ich für die Betreuung der Versuchstiere und Mithilfe bei den Tierversuchen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Ergebnisse und Diskussion	10
1 Präparation und Charakterisierung der tRNA - Methylasen aus Rattenleber	10
2 Hemmung der Methylierung	15
3 Untersuchungen zum Mechanismus der Carcinogenese durch Äthionin	28
4 Stimulierung der Methylierungsreaktion durch biogene Diamine und Polyamine	38
5 Homologe Methylierung von tRNA ^{Valin} aus Kaninchenleber	64
C. Experimenteller Teil	69
1 Material und Geräte	69
2 Enzyme	70
2.1 tRNA - Methylasen aus Rattenleber	70
2.2 S-Adenosylmethionin spaltendes Enzym aus Rattenleber	74
2.3 Ribonuklease A aus Rinderpankreas	76
2.4 Ribonuklease T ₁ aus Aspergillus oryzae	76
2.5 Ribonuklease T ₂ aus Aspergillus oryzae	77
2.6 Phosphodiesterase aus Schlangengift	77
2.7 Phosphodiesterase aus Kälbermilz	78
2.8 Phosphomonoesterase aus Kalberdarm	78

	Seite
3 Transfer - Ribonukleinsäuren	79
3.1 tRNA aus Rattenleber	79
3.2 Fraktionierte tRNA aus E. coli und Kaninchenleber	81
3.3 In vitro methylierte tRNA	81
4 Analyse der in vitro methylierten tRNA	83
4.1 Chromatographie der RNase A - und - T ₁ - Bruchstücke an DEAE Sephadex A-25	83
4.2 Entsalzen der Fraktionen	84
4.3 Identifizierung der methylierten Nukleoside	85
5 Dünnschicht - und Papierchromatographie	87
5.1 Laufmittel	87
5.2 Detektion	88
6 Ultra-Violett-Spektren	89
7 Massenspektren	89
8 Tierversuche	89
D. Zusammenfassung	92
E. Literaturverzeichnis	96
F. Lebenslauf	105

Abkürzungsverzeichnis

DNA	= Desoxyribonukleinsäure
RNA	= Ribonukleinsäure
mRNA	= Messenger-Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
rRNA	= ribosomale Ribonukleinsäure
tRNA _{E.coli}	= unfraktionierte transfer-Ribonukleinsäure aus Escherischia coli
tRNA ^{f.Met} _{E.coli}	= formylierbare Methionin-spezifische tRNA aus E. coli
tRNA ^{Valin} _{E.coli}	= Valin-spezifische tRNA aus E. coli
tRNA _{R.L.}	= unfraktionierte tRNA aus Rattenleber
tRNA ^{Valin} _{K.L.}	= Valin-spezifische tRNA aus Kaninchenleber
Ado-Met	= S-Adenosylmethionin
Ado-Hom	= S-Adenosylhomocystein
INH	= Isonikotinsäurehydrazid
Nikotinamid	= Nikotinsäureamid
DC	= Dünnschichtchromatographie
RNase	= Ribonuklease
DEAE	= Diäthylaminoäthyl-
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat
Tris	= Trishydroxymethyl-aminomethan
UZ-	= Ultrazentrifugations-
A ₂₆₀ = O.D. ₂₆₀	= Optische Dichte bei der Wellenlänge 260 nm
TEAB	= Triäthylammoniumbicarbonat
TCA	= trichloroacetic acid = Trichloressigsäure
PPO	= 2,5 Diphenyloxazol
Cellosolve	= Äthylenglykolmonoäthyläther
Oligonukleotide:	die Phosphodiesterbindungen wurden durch Striche dargestellt: A-Ap

Nukleotide und Nukleoside:

3'-Nukleotide wurden bezeichnet durch Anhängen eines p
an das Nukleosid,

5'-Nukleotide durch Vorstellen eines p

A = Adenosin

U = Uridin

C = Cytidin

G = Guanosin

m^1A = 1-Methyl-Adenosin

m^6A = N^6 -Methyl-Adenosin

m^6_2A = N^6 -Dimethyl-Adenosin

m^1G = 1-Methyl-Guanosin

m^2G = N^2 -Methyl-Guanosin

m^2_2G = N^2 -Dimethyl-Guanosin

m^7G = 7-Methyl-Guanosin

m^5C = 5-Methyl-Cytidin

m^3C = 3-Methyl-Cytidin

m^5U = rT = Ribo-Thymidin

s^4U = 4-Thio-Uridin

Ψ = Pseudo-Uridin

D = hU = Dihydro-Uridin

Cm = 2'-O-Methyl-Cytidin

Gm = 2'-O-Methyl-Guanosin

A. Einleitung und Problemstellung

Zwei für das Leben fundamentale Vorgänge finden am genetischen Material, der Desoxyribonukleinsäure, statt:

1. die Vererbung der genetischen Information von der Elternzelle auf die Tochterzelle:

D N A → D N A
(identische Reduplikation)

2. die Verwirklichung der genetischen Information innerhalb der Zelle:

D N A $\xrightarrow{\text{Transkription}}$ m R N A $\xrightarrow{\text{Translation}}$ P r o t e i n
(Proteinbiosynthese)

Während der erste Schritt der Proteinbiosynthese, die Transkription, im Zellkern vor sich geht, wird der zweite, die Translation, im Zytoplasma an den Ribosomen durchgeführt. Beim Translationsschritt spielen die transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs, oder lösliche Ribonukleinsäuren, wie sie früher genannt wurden) eine zentrale Rolle: sie transportieren Aminosäuren in aktivierter Form zu den Ribosomen. Hier werden, entsprechend der Basen-determination der Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) die Aminosäuren zu Polypeptiden verknüpft.

Die erste Nukleotidsequenz einer tRNA, der alaninspezifischen tRNA aus Hefe, veröffentlichten 1965 Holley und Mitarbeiter (1). Seitdem wurden etwa 60 tRNAs sequenziert, die Mehrzahl aus Hefe und Escherischia coli.

Von Säuger-tRNAs sind bis heute nur die Struktur von tRNA^{Serin} aus Rattenleber (2) und tRNA^{Phe} aus Kaninchenleber (3) bekannt.

Transfer-Ribonukleinsäuren bestehen aus 75 (4) bis 93 (5) Ribonukleotiden, die über 3'-5'-Phosphodiesterbindungen verbunden sind (Abb. 1).

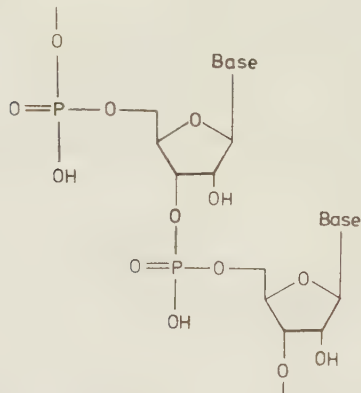


Abb. 1
Phosphodiesterbindungen in Nukleinsäuren

Wenn vorausgesetzt wird, daß Bereiche komplementärer Nukleotidsequenz durch Basenpaarung zusammengehalten werden, lassen sich alle bisher sequenzierten tRNAs zum sogenannten Kleeblattmodell anordnen (Abb. 2). Dadurch entstehen 4 Stammregionen (stems): Aminosäureakzeptorstamm, Dihydrouridinstamm, Anticodonstamm und TΨC-Stamm. In Bereichen ohne Basenpaarungen

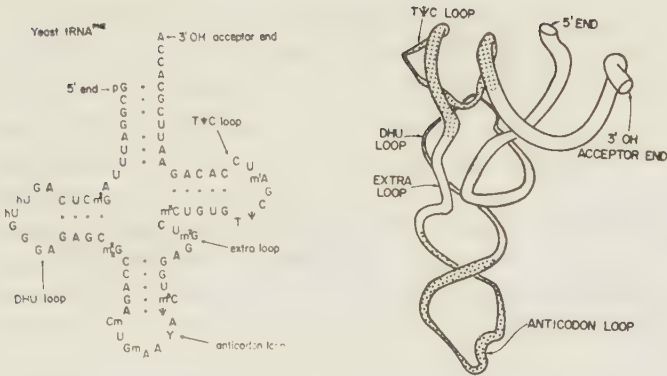


Abb. 2
Kleeblattstruktur (6) und Tertiärstruktur (7)
von tRNA^{Phenylalanin} nach (7)
Hefe

entstehen Schleifen (loops), die als Dihydrouridin-
schleife, Anticodonschleife, "Extraloop" und TΨC-
Schleife bezeichnet werden.

Am 3'-Ende des Aminosäureakzeptorstamms besitzen alle
transfer-Ribonukleinsäuren die Sequenz ...C-C-A_{OH}. Die
entsprechende Aminosäure wird mit der OH-Gruppe des 2'C
der Ribose (8, 9) verestert. Diese Reaktion wird durch
ein Aminosäure- und tRNA-spezifisches Enzym, die Amino-
säure-tRNA-Synthetase katalysiert, ATP liefert die
Energie.

Die Anticodonschleife trägt das aus 3 Nukleotiden
bestehende Anticodon. Mit diesem bindet die tRNA an die
komplementäre Sequenz in der mRNA (Abb. 3). Da der
genetische Code durch die Kombination von 3 Basen
64 Möglichkeiten für die Determination von 20 Aminosäuren

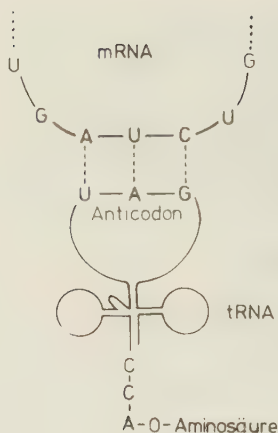


Abb. 3
Codon - Anticodon - Bindung
zwischen mRNA und tRNA

bietet, gibt es für eine Aminosäure mehrere Codons und somit auch mehrere tRNAs. Jedoch können für ein bestimmtes Codon auch mehrere tRNAs existieren, die sich in der Primärstruktur unterscheiden. So ist es erklärbar, daß in einem Organismus bis zu 80 tRNAs gefunden werden. tRNAs, welche dieselbe Aminosäure binden können, werden isoakzeptierende tRNAs genannt.

Die Sequenz -G-T-Ψ-C- im TΨC-Loop gilt als Ribosomenbindungsstelle und kommt in allen tRNAs an dieser Stelle vor. Als Ausnahme wurden erst vor kurzem die Initiator-tRNAs von Eukaryonten bekannt (10, 11).

Die Dihydrouridinschleife wird nach dem Vorkommen des seltenen Nukleosids Dihydrouridin bezeichnet. Die Bedeutung dieser Region für die Funktion der tRNA ist noch unklar.

Die Tertiärstruktur einer tRNA wurde kürzlich von Rich und Mitarbeiter (7) bei der tRNA^{Phe} aus Hefe auf Grund von Röntgenstrukturanalysen ermittelt (Abb.2,S.3).

Abweichend von anderen Nukleinsäuren enthalten die transfer-Ribonukleinsäuren bis zu 20% sogenannte seltene Nukleoside, zum Beispiel:

die Uridinderivate 4-Thio-Uridin, Pseudo-Uridin, Dihydro-Uridin, Ribothymidin (5-Methyl-Uridin),

die am Purin- oder Pyrimidinrest methylierten Nukleoside 2-Methyl- und 2-Dimethyl-Guanosin, 7-Methyl-Guanosin, 5-Methyl-Cytidin, 1-Methyl-Adenosin, 6-Methyl- und 6-Dimethyl-Adenosin,

die an der Ribose methylierten Nukleoside 2'-O-Methyl-Guanosin, 2'-O-Methyl-Uridin,

die "hypermodifizierten" Nukleoside Threonyl-carbamoyl-Adenosin, 2-Methylthio-isopentenyl-Adenosin (12).

Diese Modifizierung findet auf Polynukleotidebene, zum Teil in einer Vorstufe, der Vorläufer(Precursor)-tRNA statt (13). Die Precursor-tRNA wird an bestimmten Cistrons der DNA synthetisiert und besitzt zunächst eine Kettenlänge von 120 bis 130 Nukleotiden. Nach enzymatischer Bildung eines Teils der seltenen Basen (z. B. Ψ) wird die Kette durch ein "tayloring enzyme" auf ungefähr 80 Nukleotide verkürzt.

Funktion und biologische Bedeutung der seltenen Basen ist bis heute unbekannt geblieben.

Der Gehalt an modifizierten Nukleotiden variiert mit der evolutionären Entwicklung der transfer-Ribonukleinsäuren. Vom kleinsten bekannten Lebewesen, Mycoplasma, dessen tRNA nur eine geringe Menge seltener Nukleotide enthält (14) über die transfer-Ribonukleinsäuren von

E. coli, Hefe, Weizenkeimen, Rattenleber und Tumorzellen steigt der Gehalt an modifizierten Basen. Daher können in einem *in vitro* System transfer-Ribonukleinsäuren von niederen Lebewesen mit Enzymen aus höheren Organismen modifiziert werden: heterologe Methylierung. Von homologer Methylierung spricht man, wenn Enzym und tRNA aus demselben Organismus stammen. Da die tRNA *in vivo* mit den arteigenen Methylasen voll methyliert wird, ist homologe Methylierung *in vitro*, wie später gezeigt wird, nur in einigen Ausnahmefällen möglich.

Die Methylierung von Nukleotiden in tRNA wird von einer Vielzahl von Methylasen (15) katalysiert. Methylgruppendonator ist das "aktive Methyl", das S-Adenosylmethionin. Die Basenspezifität konnte von Hurwitz et al. (16) durch Isolierung von 6 verschiedenen Methylasen in *E. coli* und von Björk und Svensson (17) von 8 verschiedenen Methylasen in Hefe nachgewiesen werden. Baguley und Staehelin (18, 19) reinigten eine m^1A - Methylase und eine m^2G - Methylase aus Leber und Milz normaler und leukämischer Ratten.

Die ersten Arbeiten über enzymatische Methylierung von reiner, fraktionierter tRNA führten Baguley et al. (20), sowie Kuchino und Nishimura (21) durch. Baguley und Mitarbeiter verwendeten als Substrat eine serinspezifische tRNA aus Hefe, die mit einer gereinigten AdenintRNA-Methylase aus Rattenleber an derselben Stelle zu 1-Methyl-Adenosin methyliert werden konnte, an der dieses methylierte Nukleosid in 4 anderen Hefe-tRNA-Spezies auftritt. Kuchino und Nishimura erhielten durch Fraktionierung guaninspezifische Methylasen, welche

in vitro ein Guanosin in mehreren, reinen tRNA-Spezies zu 2-Methyl-Guanosin oder 2-Dimethyl-Guanosin modifizierten.

Vorbedingungen für die Versuche zur in vitro-Methylierung dieser Arbeit waren:

1. die Isolierung von partiell gereinigten Methylasen,
2. die Verfügbarkeit reiner transfer-Ribonukleinsäuren aus *E. coli*.

Halpern et al. (22) fanden Nikotinamid als natürlich vorkommenden Methylaseinhibitor. Als Wirkungsmechanismus wurde eine kompetitive Hemmung der tRNA-Methylase postuliert. In der vorliegenden Arbeit waren dazu zwei Aufgaben gestellt:

1. die Hemmung der Methylierung durch Nikotinamid zu untersuchen,
2. Isonikotinsäurehydrazid als bedeutendes Tuberkulostatikum (23) auf Hemmungsaktivität zu überprüfen.

Nach Gaben von Carcinogenen konnte in Geweben, in denen später Tumoren entstehen (24), sowie in Tumoren (25) höhere Methylaseaktivität als in Normalgeweben nachgewiesen werden. Bergquist und Matthews (26) fanden bereits 1962 ein vermehrtes Auftreten von methylierten Basen in der tRNA-Fraktion von Tumorgeweben. In der vorliegenden Arbeit war die Aufgabe gestellt, nach Gabe eines Lebercarcinogens an Ratten in bestimmten Zeitabständen in der Rattenleber

1. die Methylaseaktivität zu bestimmen,
2. nach Isolierung der tRNA unter Verwendung zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie die Nukleotidzusammensetzung der tRNA zu untersuchen.

Als Carcinogen sollte das als Lebercarcinogen (27) bekannte L-Äthionin (zur Kontrolle das als Carcinogen unwirksame D-Äthionin) gegeben werden.

Neben der Hemmung der Methylierung war auch die Frage nach der Stimulierung dieser Reaktion gestellt.

Leboy (28) und Pegg (29) beschrieben eine Stimulierung des Methylgruppeneinbaus in tRNA durch biogene Diamine und Polyamine. Durch Verwendung reiner tRNA^{f.Met}_{E.coli} als Substrat und partiell gereinigter Methylasen aus Rattenleber als Enzym sollte der Mechanismus der Stimulation der tRNA-Methylierung mit biogenen Aminen untersucht werden.

Homologe in vitro - Methylierung, die Methylierung einer tRNA mit einem Enzym aus demselben Organismus, konnte bei Säugern bisher nicht oder nur in geringem Maß gefunden werden. Daher war die Aufgabe gestellt, durch Verwendung reiner tRNA^{Valin} aus Kaninchenleber und Polyaminen die Methylierung im homologen System zu untersuchen.

Zusammenfassend sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Was ist der Mechanismus der tRNA-Methylasehemmung durch Nikotinamid?
2. Ist das Tuberkulostatikum INH ebenfalls als Inhibitor aktiv?
3. Welchen Einfluß hat die Verfütterung des Lebercarcinogens L-Äthionin auf die tRNA-Methylasen der Rattenleber?
4. Verändert sich der Gehalt an seltenen Nukleotiden in der Rattenleber-tRNA nach Gaben von L-Äthionin?

5. Verändert sich der Gehalt an seltenen Nukleotiden nach Gaben von D-Äthionin?
6. Welches ist der Mechanismus der Stimulierung der tRNA-Methylierung durch biogene Amine?
7. Kann reine tRNA^{Valin} aus Kaninchenleber im homologen System in vitro mit Kaninchenleberenzym methyliert werden?

B. Ergebnisse und Diskussion

1. Präparation und Charakterisierung der tRNA-Methylasen aus Rattenleber

Die tRNA methylierenden Enzyme sind in vivo in den Zellkernen lokalisiert. Dies konnten Kahle und Mitarbeiter (30) durch Abzentrifugieren von Leberzellkernen in organischen Lösungsmitteln und Bestimmung der Methylierungsaktivität in den isolierten Kernen nachweisen. Beim Homogenisieren von Rattenleber in hypertonischer Saccharoselösung lösen sich die Methylasen im Zellsaft und werden daher nach Ultrazentrifugation im mikrosomenfreien Überstand gefunden.

Die Mehrzahl der bisher erschienenen Arbeiten über Methylierung von tRNA benützen diesen Überstand als Enzymquelle. Ein Nachteil dabei ist, daß Nebenreaktionen durch Inhibitoren (22), Aktivatoren (31) oder durch andere Enzyme (32) die Methylierungsreaktion unkontrolliert beeinflussen können. Reinigung und Fraktionierung der Methylasen ist jedoch wegen ihrer Labilität schwierig. Littauer et al. (33) beschrieben, daß die Aktivität eines durch Calciumphosphatadsorption gereinigten Enzymextrakts bereits nach einigen Tagen Aufbewahrung bei -15°C um 50% absinkt.

In Anlehnung an die Methode von Kuchino und Nishimura (21) wurde der mikrosomenfreie Ultrazentrifugations-Überstand des Leberhomogenats an einer Hydroxylapatitsäule fraktioniert. Hydroxylapatit ist eine Calciumphosphatverbindung, die durch eine besondere Aufarbeitung in eine bestimmte Kristallform gebracht wird und Proteine

oder Nukleinsäuren durch Adsorptionskräfte bindet. Ein linearer Gradient von 0 - 0,5 molar Kaliumphosphat ergab die Auftrennung der Methylaseaktivitäten in drei Hauptgipfel (Abb. 4).

Zur Bestimmung der Aktivität wurde ein Verfahren verwendet, das es erlaubte, in einem Versuch bis zu 200 Fraktionen zu testen. Dabei wird der Inkubationsansatz für jede Fraktion auf Papierfilter gegeben.

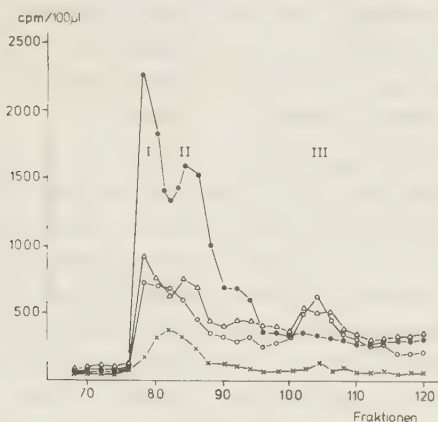


Abb. 4

Fraktionierung von Rattenleber-Methylasen an Hydroxylapatit (2.lb,c im Exp. Teil)
Gradient: 0 (Fr.60) - 0,5 (Fr.175) molar Kaliumphosphat pH 8,0
Substrate für die Methylierung:

(●—●) = tRNA^{f.Met}_{E.coli} , (Δ—Δ) = tRNA_{E.coli} ,

(○—○) = tRNA^{Valin}_{E.coli} , (x—x) = ohne tRNA = Protein,

Methylgruppendonator: (¹⁴C-Methyl-)Ado-Met

Durch Waschen der Filter in Trichloressigsäure löst sich der unverbrauchte ^{14}C -markierte Methylgruppen-donator S-Adenosylmethionin, während tRNA und Protein mit den akzeptierten Methylgruppen als säureunlösliche Verbindungen auf dem Filter präzipitiert werden (34). Zur Charakterisierung der Methylasepeaks wurde neben tRNA_{E.coli} eine reine tRNA_{E.coli}^{f.Met} und eine reine tRNA_{E.coli}^{Valin} als Substrat verwendet. Unter Normalbedingungen (mit Mg^{++} im Inkubationsansatz) wird tRNA_{E.coli}^{f.Met} nur von den Methylaseaktivitäten I und II, während tRNA_{E.coli}^{Valin} zusätzlich von III methyliert wird (Abb. 4). Bei diesen Bedingungen sind die Methylasen guaninspezifisch (21, Kapitel 4 dieser Arbeit).

Die gesammelten Fraktionen der Methylasen I, II, III wurden nach Ammonsulfatfällung gegen einen 50% Glycerin enthaltenden Puffer dialysiert. Dadurch konnten die Methylasezubereitungen bei -20°C aufbewahrt werden, ohne daß durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren Aktivitätsverluste zu befürchten waren. Die Methylasen blieben bis zu zwei Monate stabil, wie die öfter durchgeführten Methylierungskinetiken zeigen konnten.

Die Methylierung von bestimmten Proteinen durch Enzyme aus dem Zellsaft wird beschrieben von Paik und Kim (35). S-Adenosylmethionin dient dabei ebenfalls als Methyl-donator. Methyliert werden hauptsächlich die ω -Carboxylgruppen der sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure, z.B. im Ovalbumin, und die ω -Amino-gruppen der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin, z.B. in Histonproteinen. Durch Weglassen des Substrates tRNA ergibt sich in den Hydroxylapatitfraktionen die Protein-Methyltransferasenaktivität (Abb. 4).

Unfraktionierte Rattenleber-tRNA, die als löslicher Bestandteil des Cytoplasmas ebenfalls in den Hydroxylapatitfraktionen enthalten ist, kann im homologen System nicht methyliert werden (33, Abb. 5).

Das Ziel der Versuche zur enzymatischen Methylierung war es, eine Sättigung der tRNA mit Methylgruppen zu erhalten. Deshalb wurden die Versuchsbedingungen so gewählt, daß mindestens nach einer Stunde Inkubation ein Plateau erreicht wurde. Das Substrat tRNA war immer limitierend, Enzym und S-Adenosylmethionin wurden im Überschuß verwendet.

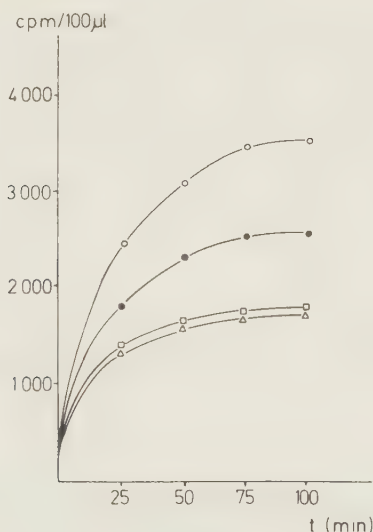


Abb. 5

Methylierungskinetik mit verschiedenen tRNAs und Methylase I (2.1h im Exp. Teil)

(□—□) = tRNA_{Rattenleber} , (●—●) = tRNA_{E.coli}

(○—○) = tRNA_{E.coli}^{f.Met} , (△—△) = ohne tRNA = Protein

Für eine rationelle Verwendung des radioaktiv markierten Methylgruppendonators wurde die optimale Konzentration ermittelt. Wie die Abbildung 6 zeigt, genügten die verwendeten 1,440 nM (= 20 nCi) (^{14}C -Methyl-)S-Adenosylmethionin für die Sättigung der tRNA mit Methylgruppen. Nach Hoskinson und Khorana (36) entspricht 1 O.D._{260nm} tRNA 1,66 nM, die im Inkubationsansatz vorhandenen 0,05 O.D._{260nm} demgemäß 83 pM. Die verwendeten 1,440 nM Ado-Met entsprechen also einem siebzehnfachen Überschuß, bezogen auf die Konzentration der tRNA.

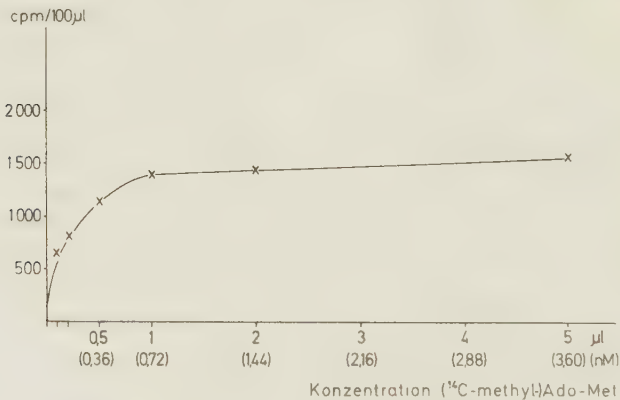


Abb. 6

Abhängigkeit der tRNA-Methylierung von der (^{14}C -Methyl-) S-Adenosylmethionin-Konzentration

Substrat: 0,05 O.D._{260nm} tRNA^{f.Met}_{E.coli} ,

Enzym: Methylase I

2. Hemmung der enzymatischen Methylierung

Eine gegenüber dem Normalgewebe erhöhte Methylaseaktivität wurde in Tumoren (25) und in embryonalen Geweben (37, 38) gefunden. Daher ist die Vermutung geäußert worden, daß erhöhte Methylaseaktivität für erhöhtes Wachstum und für Differenzierungsvorgänge charakteristisch ist. Zwei Ursachen werden für diesen Befund diskutiert: entweder eine erhöhte Synthese der Methylasen oder die Anwesenheit von natürlichen Inhibitoren in Normalgeweben und deren Fehlen in Geweben mit höheren Methylierungsaktivität (39).

Kerr (40) beschreibt die Abwesenheit eines natürlichen Inhibitors in foetalen Geweben und Tumorgeweben. In normalen Geweben ist dieser Inhibitor nach Kerr (32) auf ein Enzymsystem zurückzuführen, das Glycin mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator zu Sarkosin methyliert, wodurch eine größere Menge S-Adenosylhomocystein entsteht. Dieses wirkt in vitro als Inhibitor der tRNA-Methylasen (41, 42).

Halpern et al. (22) isolierten aus Rattenleber einen dialysierbaren tRNA-Methylaseinhibitor, der als Nikotinamid identifiziert werden konnte. In Walker 256 Tumoren konnten sie den Inhibitor nicht nachweisen (43).

In Abbildung 7 wird dargestellt, daß Nikotinamid nicht nur, wie von Halpern et al gefunden, ein Inhibitor der tRNA-Methylierung (Abb. 8, 9) ist, sondern auch die Protein-Methylierung hemmt (44).

Folgende Überlegungen veranlaßten die Untersuchung von Isonikotinsäurehydrazid (INH) auf Hemmungsaktivität im tRNA- und Protein-Methylierungssystem:

- Isonikotinsäurehydrazid weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Nikotinsäureamid auf.
- INH-Adenindinukleotid wird als NAD-Analoges in NAD-abhängigen Enzymreaktionen verwendet (45).
- Nach Plempel (46) beruht die Wirkung des INH als Tuberkulostatikum auf einen Anti-metabolismus mit Nikotinamid.

Wie die Abbildungen 7,8,9 zeigen, hemmt INH die Protein-Methylierung, die Methylierung von unfractionierter $\text{trNA}_{\text{E.coli}}$ und die Methylierung von reiner $\text{trNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$.

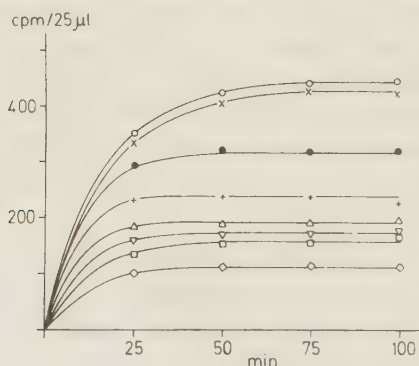


Abb. 7

Methylierung von Protein mit Methylase I bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (2.1h im Exp. Teil)

- (○—○) = ohne Inhibitor, (x—x) = 1 mmol Ethidiumbromid,
- (●—●) = 5 mmol INH, (+—+) = 10 mmol INH,
- (△—△) = 20 mmol INH, (▽—▽) = 30 mmol INH,
- (□—□) = 50 mmol INH, (◇—◇) = 10 mmol Nikotinamid

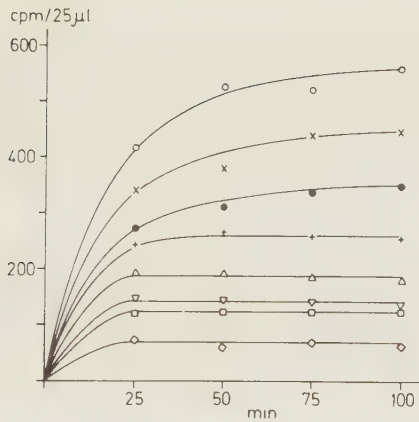


Abb. 8
Methylierung von tRNA_{E.coli} mit Methylase I bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (2.lh im Exp. Teil), Symbole wie in Abb.7

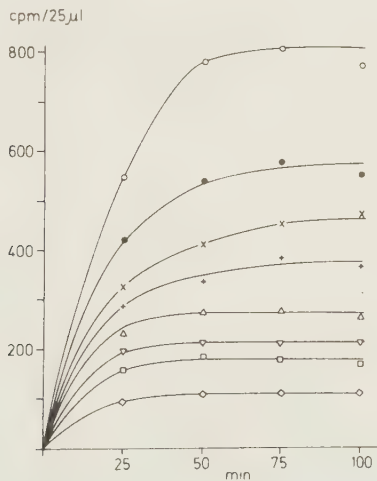


Abb. 9
Methylierung von tRNA_{f.Met} mit Methylase I bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (2.lh im Exp. Teil), Symbole wie in Abb.7

Die Hemmungsaktivität ist am größten bei einer Konzentration von 30 mmolar (Abb. 10), weiteres Ansteigen der INH-Konzentration bleibt ohne Einfluß auf die Hemmung. Die gleich starke Hemmung wie mit Nikotinamid kann bei dieser Konzentration jedoch nicht erreicht werden (Abb. 7,8,9).

Zum Wirkungsmechanismus des INH bei der Behandlung der Tuberkulose wird angenommen, daß die Hydrazingruppe des INH eine Transportgruppe darstellt, welche die Beförderung der Isonikotinsäure durch die Bakterienmembran ermöglicht (47). Isonikotinsäure, die als Wirkform des INH vermutet wird, zeigte jedoch in vitro keine Hemmungswirkung auf die enzymatische Methylierung. Ebenso wenig wirksam war Nikotinsäure.

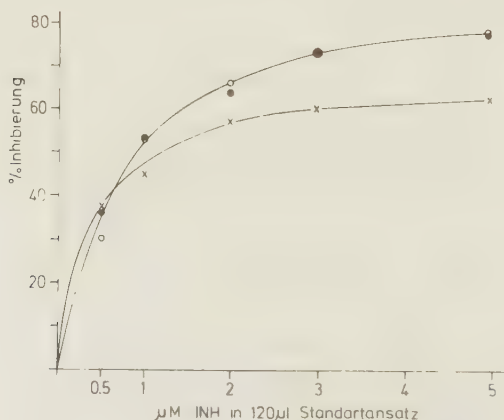


Abb. 10

Hemmung der Methylierung mit Methylase I in Abhängigkeit der INH-Konzentration (1 µM INH = 10 mmol)

(O—O) = tRNA_{E.coli} (●—●) = tRNA_{E.coli}^{f.Met} (x—x) = Protein

Ein Inhibitor, der nur die tRNA-Methylierung hemmt, ist Ethidiumbromid (2,7-Diamino-9-phenyl-10-äthyl-phenantridin bromid) (29,48), wie in den Abbildungen 7,8,9 zu sehen ist. Planare organische Verbindungen, wie zum Beispiel Ethidiumbromid, Proflavin, Aktinomycin, verändern durch Intercalation in helikalen Bereichen (Einschiebung zwischen die Basenpaare) die Tertiärstruktur von Nukleinsäuren (49,50). Dadurch wird die tRNA als Substrat von den Methylasen nicht mehr akzeptiert und kann nicht methyliert werden. Die Protein-Methylierung wird durch Ethidiumbromid nicht beeinflusst (44).

Die von Hurwitz et al. (41) und von Wainfan und Borek (51) beobachtete Hemmung der unfractionierten tRNA-Methylasen mit Adenosin in vitro konnte nicht bestätigt werden. Die partiell gereinigten Methylasen ließen sich weder mit Adenosin noch durch Guanosinphosphat oder Uridinphosphat hemmen.

Folgende Beobachtungen regten zur Untersuchung des Mechanismus der Methylierungshemmung mit INH oder Nikotinamid an (52):

- a. Beide Verbindungen hemmen tRNA- und Protein-Methylierung mit Methylase I bzw. II.
- b. Eine Methylase-III-Präparation konnte nicht gehemmt werden.
- c. Die Kinetiken der Hemmung zeigen für jede Konzentration des Inhibitors ein neues Plateau (Abb. 7,8,9). Dies weist auf eine irreversible Substrathemmung hin. Bei einer kompetitiven Hemmung, welche Halpern (22) als Mechanismus fordert, ist die Reaktionsgeschwindigkeit

verlangsamt, die Methylierungsreaktion kommt jedoch immer auf die Plateauhöhe, welche ohne Inhibitor erreicht wird.

- d. Dünnschichtchromatographie der Methylierungsreaktion mit INH oder Nikotinamid zeigt das Auftreten von neuen radioaktiv markierten Produkten (Abb. 11).

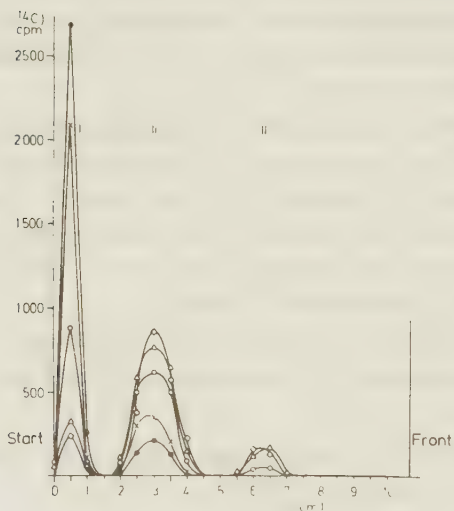


Abb. 11

Dünnschichtchromatographie der von INH oder Nikotinamid gehemmten Methylierungsreaktion (2.2b im Exp. Teil). Eine Methylase-I-Präparation, welche Ado-Met spaltendes Enzym enthielt, wurde mit (^{14}C -Methyl-)Ado-Met inkubiert. Laufmittel: A (5.1a im Exp. Teil)

Inkubation mit INH: (●—●) = 0 Min. (x—x) = 5 Min.
(○—○) = 15 Min. (Δ—Δ) = 30 Min.

Inkubation mit Nikotinamid: (□—□) = 5 Min.

I = (^{14}C -Methyl-)Ado-Met, II, III = Abbauprodukte von I, Inkubation mit (^{14}C -Carboxyl-)Ado-Met gab ein identisches Bild.

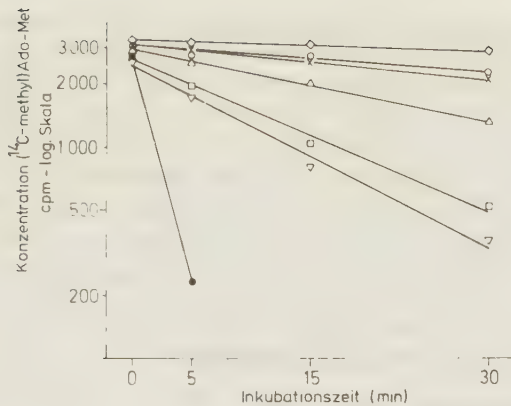


Abb. 12

Quantitative Auswertung des (^{14}C -Methyl-)Ado-Met-Abbaus nach Inkubation mit verschiedenen Proteinmengen und DC. Die Messpunkte wurden durch Auswertung des Peak I von Dünnschichtchromatogrammen (wie Abb.11) erhalten.

- (◇—◇) = ohne Protein, mit INH oder Nikotinamid,
 - (○—○) = mit 1,8 mg Protein (Methylase I), ohne INH,
 - (x—x) = mit 0,3 mg Protein
 - (Δ—Δ) = mit 0,6 mg Protein
 - (□—□) = mit 1,2 mg Protein
 - (▽—▽) = mit 1,8 mg Protein
 - (●—●) = mit 1,8 mg Protein und 1 μM Nikotinamid
- } und 5 μM INH

Diese Beobachtungen wären erklärbar, wenn eine der drei folgenden Reaktionen stattfinden würde:

1. In der Methylasepräparation ist Nikotinamid-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.1.) (53,54) enthalten.

Wenn dieses Enzym mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit Nikotinamid oder INH methyliert, kann es der tRNA- bzw. Protein-Methylase das Substrat

S-Adenosylmethionin entziehen.

Dies konnte ausgeschlossen werden durch die Verwendung eines S-Adenosylmethionins, bei dem nicht die Methylgruppe, sondern die Carboxylgruppe ^{14}C -markiert war. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung zeigte dieselben Reaktionsprodukte wie bei Verwendung des Ado-Met mit ^{14}C -markierter Methylgruppe (Abb. 11).

2. Nikotinamid oder INH selbst verursachen den Abbau des S-Adenosylmethionins.

Abbildung 12 zeigt jedoch, daß die zwei Verbindungen ohne Protein keine Wirkung auf den Methylgruppendonator haben.

3. Ein Ado-Met spaltendes oder veränderndes Enzym in Rattenleber wird durch Nikotinamid oder INH aktiviert oder braucht es als Coenzym.

Hinweise für die Existenz eines Ado-Met spaltenden Enzyms wurden durch Dünnschichtchromatographie der Methylierungsreaktion erhalten:

--- Nur mit Nikotinamid oder INH und Protein entstanden radioaktiv markierte Abbauprodukte von Ado-Met.

Protein ohne Nikotinamid oder INH katalysierte die Reaktion wenig (Abb. 12).

--- Kinetiken mit gleichbleibender INH-Konzentration aber ansteigender Proteinmenge zeigten die Abhängigkeit der Reaktion von einem Proteinbestandteil der Methylasepräparation (Abb. 12).

Um dieses Ado-Met spaltende Enzym in den Hydroxylapatitfraktionen des mikrosomenfreien Rattenleberüberstands zu lokalisieren, wurde ein Enzymtest entwickelt:

Zu den Testansätzen zur Bestimmung der Methylierungsaktivität mit $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}$ (Abb. 4) wurde eine Methylase-III-Präparation als Hilfsenzym und Nikotinamid (oder INH) gegeben. Diese Methylase III ist, wie vorher getestet wurde, durch Nikotinamid nicht hemmbar.

In jeder Fraktion wird damit beim Test $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}$ methyliert. In Fraktionen, welche das Ado-Met spaltende Enzym enthalten, ist die Methylierung reduziert (Abb. 13, Fraktion 78 - 90), da der Methylgruppen-

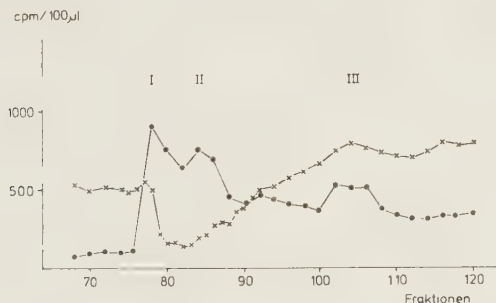


Abb. 13

Fraktionierung von Rattenleber-Methylase und Nikotinamid-abhängigem Ado-Met spaltenden Enzym an Hydroxylapatit (2.2a im Exp. Teil)

Gradient: 0 (Fr.60) - 0,5 (Fr.175) molar Kaliumphosphat pH 8,0

(●—●) = Methylierung von tRNA aus *E. coli*

(x—x) = Hemmung der Methylierung durch das Ado-Met spaltende Enzym (die Aktivität des Enzyms ist dort am größten, wo der Einbau von aktiven Methylgruppen in die tRNA am geringsten ist)

donator mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit inaktiviert wird. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist, enthalten die Fraktionen, die für die Präparation der Methylase I und II verwendet werden, auch die Ado-Met spaltende Aktivität.

Mit diesen Versuchen ist gezeigt worden, daß Nikotinamid nicht als Inhibitor der tRNA-Methylasen aufzufassen ist. Die Hemmung der Methylierung beruht vielmehr auf einer irreversiblen Substrathemmung, die von Nikotinamid oder INH durch Aktivierung eines Ado-Met spaltenden oder verändernden Enzyms ausgelöst wird.

Mit einer durch Ammonsulfatfällung der entsprechenden Säulenfraktionen (Abb. 13, Fraktion 79 - 89) erhaltenen Enzympräparation wurde versucht, die entstehenden Produkte zu charakterisieren.

Durch die Verwendung von S-Adenosylmethionin mit ^{14}C -markierter Carboxyl- oder Methylgruppe (Abb. 11) konnte gezeigt werden, daß die Reaktionsprodukte die Methyl- und die Carboxylgruppe enthalten. Daher ist das Ado-Met spaltende Enzym nicht identisch mit der Ado-Met-Decarboxylase, die in Rattenleber vorkommt (55).

Eine Spaltung zwischen Ribose und Methionin wurde ausgeschlossen durch Cochromatographie der enzymatischen Spaltprodukte von Ado-Met mit Methionin. Methioninsulfoxid und Methioninsulfon in drei verschiedenen Laufmitteln (Tab. 1, die radioaktiven Ado-Met-Zerfallsprodukte wurden durch Bestimmung der Aktivität, die Testsubstanzen durch Besprühen mit Ninhydrinlösung lokalisiert). Methioninsulfoxid und -sulfon wurden in die Untersuchungen mit einbezogen, da sie sehr leicht

	Laufmittel und Rf-Werte			Detektion mit Ninhydrin
	A	B	C	
Peak I (Abb.11) (Ado-Met)	0,1	0,04	0,32	+
Peak II (Abb.11)	0,27	0,3	0,64	-
Peak III (Abb.11)	0,56	0,67	0,25	-
INH	0,58	-	-	(-)
Nikotinamid	0,71	0,8	0,3	(-)
Ado-Hom	0,18	0,23	0,1	+
Methionin	0,46	0,57	0,66	+
Met-sulfoxid	0,3	0,48	0,8	+
Met-sulfon	0,29	0,44	0,82	+

Tabelle 1

Rf-Werte der Ado-Met-Spaltprodukte und Testsubstanzen
(Laufmittel: 5.1a im Exp. Teil)

aus Methionin entstehen können und in Methioninlösungen immer gefunden werden.

Da sich die Reaktionsprodukte nach Dünnschichtchromatographie nicht mit Ninhydrinlösung anfärben ließen, wurde vermutet, daß die α -Aminogruppe fehlt bzw. oxidiert ist. Eine eindeutige Identifizierung der Produkte als Hydroxy- oder Ketobuttersäurederivat war jedoch nicht möglich.

Die α -Aminogruppe des Ado-Met ist für die Wirkung als Methylgruppendonator notwendig. Dies konnten Zappia et al. (56) zeigen durch Verwendung von Adenosyl-4-thiomethyl-1-hydroxybuttersäure bei drei verschiedenen enzymatischen Methylierungsreaktionen (Histamin-, Acetylserotonin-, Homocystein-Methylierung). Mit dieser Verbindung als Substrat können keine Methylgruppen übertragen werden.

Wirksam waren auch NAD und NADH: diese beiden Verbindungen aktivierten in derselben Konzentration wie Nikotinamid das Ado-Met spaltende Enzym in vitro. Jedoch ist unwahrscheinlich, daß Nikotinamid in vitro zuerst in NAD umgewandelt wird und das Umwandlungsprodukt die Aktivierung einer Oxydase oder Transaminase bewirkt.

Zur Frage, ob sich das Ado-Met spaltende oder verändernde Enzym in vivo durch Gaben von Nikotinamid beeinflussen läßt, wurden Ratten mit 0,5% Nikotinamid (der höchstmöglichen Dosis) im Normalfutter drei Monate lang gefüttert. Wenn das Enzym auf diese Weise aktiviert werden kann, dann sollte die tRNA der Tiere wegen Mangel an Methylgruppendonator S-Adenosylmethionin unvollständig methyliert sein. Wenn die tRNA unvollständig

methyliert ist, sollte sie im homologen System in vitro mit Rattenleberenzym aus normalen Ratten methyliert werden können.

Aus den Lebern der Nikotinamid-gefütterten Ratten wurde die tRNA isoliert und versucht, diese mit Methylase I, II und III aus der Rattenleber von Normaltieren in vitro zu methylieren. Der Methylgruppeneinbau blieb auf dem Niveau der normalen Rattenleber-tRNA (Abb. 5, Seite 13).

Bei diesem Versuch konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß Nikotinamid im Stoffwechsel metabolisiert oder abgebaut wird und deshalb für eine in vivo-Aktivierung des Ado-Met spaltenden Enzyms ausfällt.

Welche regulatorische Aufgabe das Enzym in vivo wahrnimmt, ist bis jetzt nicht bekannt. Unwahrscheinlich ist, daß es die Aufgabe hat, den S-Adenosylmethionin-Spiegel zu regulieren. Für die Natur wäre es unökonomisch, eine Verbindung wie das aktive Methyl, für dessen Bildung hohe Energie aufgewendet werden mußte, ohne ersichtlichen Nutzen zu zerstören.

3. Untersuchungen zum Mechanismus der Carcinogenese durch L-Äthionin

Seit der Beobachtung von Bergquist und Matthews (26), daß die Ribonukleinsäuren mancher Tumore einen höheren Gehalt an methylierten Basen als die von Normalgeweben haben, wurde versucht, die Methylierung von Nukleinsäuren, besonders die von transfer-Ribonukleinsäuren, in Verbindung mit dem Mechanismus der Carcinogenese zu bringen. Diese vermehrte Methylierung soll durch eine Aktivitätserhöhung oder Spezifitätsänderung der natürlich vorkommenden Methyltransferasen (57,58) bewirkt werden. Erhöhte Methylaseaktivität wurde in einer Vielzahl von Tumoren gefunden, z.B. in menschlichen Brusttumoren und Rattenhepatomen (59), in Maushepatomen (60), in SV 40 induzierten Hamstertumoren (61,62), in Morris-Hepatomen (63).

Andererseits werden Nukleinsäuren von tumor erzeugenden chemischen Verbindungen direkt alkyliert. Farber und Magee (64,65) beschrieben die Alkylierung von RNA der Leber durch die Lebercarcinogene Dimethylnitrosamin (66) und L-Äthionin (27) nach Verfütterung an Ratten. Jedoch wird nach Gaben von Dimethylnitrosamin (67) oder L-Äthionin (68) auch erhöhte Methylaseaktivität in der Leber gefunden. Diese Befunde würden zu einer Theorie von Borek (69) passen, wonach chemische Carcinogenese auf der Aktivierung von onkogenen Viren beruhen soll. Diese Viren sollen die Entstehung veränderter tRNAs bewirken, vermutlich durch die Aktivität von Virus-spezifischen tRNA-Methyltransferasen.

Erhöhte Methylaseaktivität wird nicht nur in L-Äthionin-induzierten Lebercarcinomen, sondern auch bereits im präcarcinogenen Stadium beschrieben. Moore und Smith (70) fanden nach einmonatiger 0,2% L-Äthioninfütterung an Ratten ein Ansteigen der tRNA-Methylaseaktivität in der Leber um das zweifache. Hancock (71) konnte eine erhöhte Aktivität nachweisen, bevor eine cancerogene Veränderung der Leber zu sehen war.

a. Methylaseaktivität und -spezifität

Auf der Suche nach den molekularen Grundlagen der chemischen Carcinogenese ist es wesentlich, die frühesten irreversiblen Veränderungen im Zielorgan festzustellen, akute toxische Effekte jedoch auszuschließen. Deshalb wurden die Rattenlebern einmal sofort nach Absetzen der einmonatigen bzw. dreimonatigen 0,3% L-Äthioninfütterung und zum anderen nach zehn weiteren Tagen, in denen die Tiere wieder normales Futter erhalten hatten, auf Methylaseaktivität und -spezifität untersucht (Tierversuchsplan im Exp. Teil: Kap. 8, Tabelle 4).

Fraktionierung durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie wurde durchgeführt, um eine geänderte Spezifität der Methylasen feststellen zu können. Alle Tierversuche zeigten mit $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$, $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{Valin}}$ und Protein als Substrat ein Methylasemuster wie in Abbildung 4, Seite 11. Diese Befunde stehen im Einklang mit Ergebnissen von Nishimura (72) und Staehelin (19), die zeigen konnten, daß durch Enzympräparationen aus normalen Geweben und aus Tumorgeweben die gleichen Nukleotide methyliert werden.

Methylasequelle	tRNA _{E.coli}		tRNA ^{f.Met} _{E.coli}		tRNA ^{Valin} _{E.coli}	
	cpm	%	cpm	%	cpm	%
O - Wert	260	100	500	100	225	100
3 Monate L-Äthionin 0,3%	455	175	650	130	335	150
3 Monate L-Äthionin 0,3% + 10 Tage Normalfutter	245	94	440	88	235	105

Tabelle 2

Methylaseaktivität des mikrosomenfreien UZ-Überstandes nach Ammonsulfatfällung und Dialyse (2.lf im Exp. Teil)

Methylgruppendonator: (¹⁴C-Methyl-)Ado-Met

(die cpm entsprechen den in tRNA eingebauten ¹⁴C-Methylgruppen und wurden auf gleiche Proteinmengen bezogen)

Für die Bestimmung der Aktivitätshöhe ist die Hydroxylapatit-Fraktionierung nicht besonders geeignet, da durch die längere Bearbeitungsdauer Aktivitätsverluste auftreten können. Deshalb wurde zur Bestimmung der Aktivität ein mikrosomenfreier UZ-Überstand verwendet, der nur durch Ammonsulfatfällung und Dialyse gereinigt wurde. Für jeden Versuch wurden 12 Rattenlebern zerkleinert und durchgemischt, um individuelle Schwankungen auszugleichen.

Nach einmonatiger L-Äthioninfütterung konnte keine Aktivitätserhöhung festgestellt werden. Tabelle 2 zeigt einen Anstieg der Aktivität nach 3 Monaten L-Äthioninfütterung, der jedoch nach 10 Tagen Normalfutter wieder verschwindet. Die beobachtete Erhöhung der tRNA-Methylase-

aktivität scheint demnach ein akuter cytotoxischer Effekt zu sein, der mit der Carcinogenese in keinem Zusammenhang steht. Diese Fütterung mit Normalfutter im Anschluß an L-Äthionin-Gaben wurde von anderen Autoren (70,71) nicht durchgeführt.

b. Nukleotidzusammensetzung der tRNA

Von jeder Versuchsreihe wurde aus den Lebern der Tiere tRNA isoliert und nach RNase T₂-Spaltung mittels zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie die Nukleotidzusammensetzung untersucht. Überraschenderweise fehlte ein zunächst noch unbekanntes modifiziertes Nukleotid in der tRNA von ein Monat und drei Monate mit L-Äthionin gefütterten Tieren (Abb. 14). Ein akuter toxischer Effekt kann ausgeschlossen werden, da auch die tRNA von Tieren, die anschließend an die L-Äthioninfütterung 10 Tage Normalfutter bekommen hatten, dieses Nukleotid nicht (oder nur in geringen, auf der Dünnschichtplatte nicht sichtbaren Mengen) enthielt. Auch eine Wiederholung des Versuches mit vierwöchiger L-Äthioninfütterung bestätigte das Fehlen des vorerst unbekannten Nukleotids. In der tRNA von Tieren, die nur Normalfutter erhalten hatten und in solchen, bei denen die Tiere einen Monat lang mit 0,3% D-Äthionin gefüttert worden waren, konnte das Nukleotid in mehreren verschiedenen Versuchsansätzen immer sicher und eindeutig nachgewiesen werden.

Für die Identifizierung des Nukleotids wurde eine größere Menge tRNA aus Rattenleber von Normaltieren mit RNase T₂ gespalten und die Nukleotide mittels Papierchromatographie aufgetrennt. Nach Eluierung des fraglichen Nukleotids wurde dieses mit Phosphatase

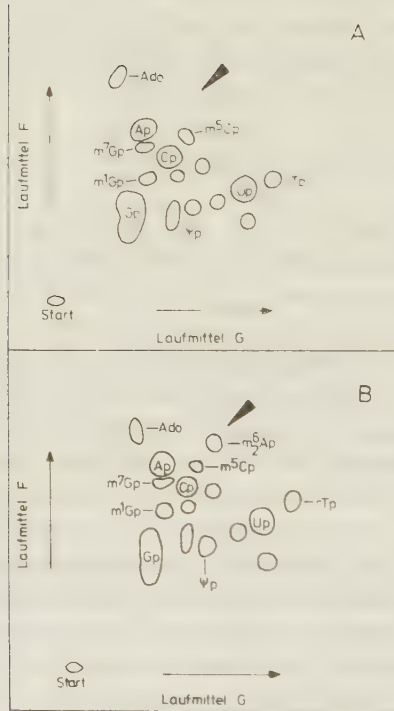


Abb. 14

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Nukleotide aus Rattenleber-tRNA (RNase T2-Spaltung: 2.5a, Laufmittel: 5.1d im Exp. Teil)

A = tRNA aus der Leber von mit L-Äthionin-gefütterten Tieren

B = tRNA aus der Leber von mit D-Äthionin- bzw. mit Normalfutter-gefütterten Tieren

Die Identifizierung der einzelnen Nukleotide erfolgte teils durch M. Saneyoshi (unveröffentlicht), teils durch Elution und anschließende Ultra-Violett-Spektroskopie.

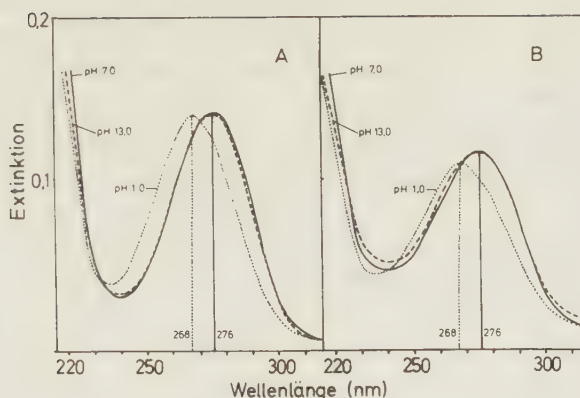


Abb. 15

Ultra-Violett-Spektren von N^6 -Dimethyl-Adenosin

A = authentisches Material

B = aus tRNA von Lebern normaler Ratten isoliertes Nukleosid

hydrolysiert, das so entstandene Nukleosid dünn-schicht-chromatographisch (Laufmittel D) gereinigt und von diesem ein Ultra-Violett-Spektrum aufgenommen (Abb. 15B). Dieses ließ vermuten, daß es sich um N^6 -Dimethyl-Adenosin handeln könnte. Das Ultra-Violett-Spektrum von authentischem N^6 -Dimethyl-Adenosin zeigt Abbildung 15A.

Dünnschichtchromatographie in 4 verschiedenen Laufmitteln erbrachte einen weiteren Hinweis für Identität mit dem Vergleichsmaterial (Tabelle 3).

Der endgültige Beweis wurde durch den Vergleich des Massenspektrums der isolierten Substanz mit dem der authentischen Verbindung erhalten. Abbildung 16 zeigt die Übereinstimmung im Molekulargewicht (295) und in charakteristischen Fragmenten.

	Laufmittel und Rf-Werte			
	D	H	I	K
isoliertes Nukleosid	0,71	0,65	0,62	0,64
authentisches m_2^6A	0,71	0,65	0,62	0,63

Tabelle 3

Rf-Werte von N^6 -Dimethyl-Adenosin in verschiedenen Laufmitteln (5.1b,e im Exp. Teil)

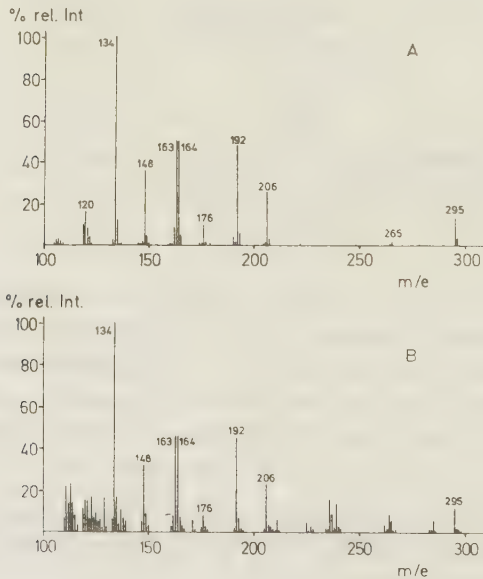


Abb. 16

Massenspektrum von N^6 -Dimethyl-Adenosin:

A = authentisch

B = tRNA aus Lebern normaler Ratten (ca 5 μ g, isoliert aus 10 Papierchromatogrammen)

Die im niedermolekularen Bereich des Massenspektrums von B zusätzlich auftretenden Fragmente entstammen dem für die Chromatogramme verwendeten Papier (73,74)

N^6 -Dimethyl-Adenosin wurde bisher in keiner der ungefähr 60 sequenzierten transfer-Ribonukleinsäuren beschrieben. Bestätigt wird das Vorkommen in unfraktionierter tRNA aus Rattenleber durch die Untersuchungen von Dunn (75). Lai und Weisblum (76) fanden N^6 -Dimethyl-Adenosin in der 23 S rRNA eines Erythromycin-resistenten Staphylococcus aureus-Stammes. Dies könnte ein Hinweis auf eine biologische Bedeutung des Nukleosids sein (in nicht-resistenten Stämmen ist es auffallenderweise nicht enthalten). Fellner und Sanger (77) konnten die Verbindung in der 16 S Fraktion der rRNA von E. coli-Stämmen nachweisen. Die Möglichkeit, daß das in der vorliegenden Arbeit gefundene N^6 -Dimethyl-Adenosin aus rRNA stammt, kann jedoch ausgeschlossen werden, denn die tRNA, die nach der im experimentellen Teil beschriebenen Methode isoliert wurde, enthält außer tRNA nur noch etwa 3 - 5% 5 S rRNA (76), welche völlig unmethyliert ist (79).

Das Fehlen eines modifizierten Nukleosids nach Gaben von L-Äthionin (in Lebern mit D-Äthionin gefütterter Ratten wurde N^6 -Dimethyl-Adenosin wie in Lebern von Normaltieren gefunden) ist ein neuer und überraschender Befund.

Über die Ursache dieser Veränderung oder über die Auswirkungen auf die Funktion der tRNA ist nichts bekannt. Bisher wurde nur (nach Injektion von ^{14}C -Äthyl-L-Äthionin in Ratten) das Auftreten neuer modifizierter Nukleotide beschrieben, hauptsächlich äthylierter Guanosinderivate (80,81).



Abb. 17

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie der Nukleotide aus in vivo äthylierter tRNA (8.b im Exp. Teil)

helle Flecken: im Ultra-Violett-Licht sichtbar

schraffierte Flecken: nach Autoradiographie sichtbar

Eigene Untersuchungen konnten das Auftreten äthylierter Nukleotide bestätigen. Wie die Abbildung 17 zeigt, wird die tRNA einer mit (^{14}C -Äthyl-)L-Äthionin i.p. injizierten Ratte an mehreren Nukleotiden äthyliert. Da jedoch bei der Dünnschichtchromatographie der Nukleotide aus Tieren, die ein Monat oder drei Monate mit L-Äthionin gefüttert worden waren, keine neuen modifizierten Nukleotide gefunden wurden (Abb.14, Seite 32), ist die Äthylierung (im Gegensatz zum Fehlen des N^6 -Dimethyl-Adenosins) als schwacher Effekt anzusehen.

Es ist bekannt, daß S-Adenosyläthionin nach L-Äthioningaben in der Rattenleber gebildet und angereichert wird

(82,83,84). Nach Ortwerth und Novelli (85) kommt ersteres als Äthylgruppendonator nicht oder nur zu einem geringen Prozentsatz in Frage: für die Äthylierung wird ein anderer, noch unbekannter Wirkungsmechanismus gefordert. S-Adenosyläthionin könnte jedoch eine kompetitive Hemmung der tRNA-Methylierung bewirken. Moore und Smith (70) und Pegg (42) beschreiben eine solche Hemmung in vitro. Diese Erscheinung könnte die Ursache für das Fehlen von N⁶-Dimethyl-Adenosin in der tRNA von L-Äthionin-gefütterten Ratten sein (Hemmung der Biosynthese).

D-Äthionin kann nicht zu S-Adenosyläthionin aktiviert werden (86). Das ist vielleicht der Grund dafür, daß in D-Äthionin-gefütterten Tieren die Biosynthese von N⁶-Dimethyl-Adenosin in der tRNA nicht gehemmt ist.

Eine Veränderung im Gehalt an modifizierten Basen kann zu einer Verminderung oder zum Auftauchen von neuen isoakzeptierenden tRNA-spezies führen. Axel et al. (87) zeigten das Verschwinden von zwei Leucinspezifischen tRNAs nach Gaben von L-Äthionin an Ratten. Ob dieses durch das Verschwinden des N⁶-Dimethyl-Adenosins oder durch das Auftauchen von äthylierten Nukleotiden bewirkt wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

4. Stimulierung der Methylierungsreaktion durch biogene Diamine und Polyamine

Die biologische Bedeutung der im Organismus weit verbreiteten Diamine Putrescin und Cadaverin und der Polyamine Spermidin und Spermin ist unklar. Sie stimulieren in vitro, neben anderen, besonders Enzymreaktionen, an denen Nukleinsäuren beteiligt sind, zum Beispiel die mRNA - Synthese der DNA abhängigen RNA Polymerase (88), die Aminoacylierung der tRNA durch die tRNA-Aminosäure-Synthetase (89,90) und die Methylierung der tRNA durch die tRNA-Methyltransferasen (28,29).

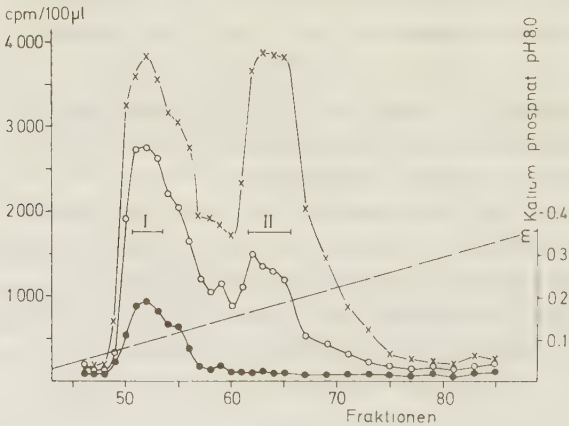


Abb. 18

Fraktionierung von Rattenleber-Methylase an Hydroxylapatit (2.1c im Exp. Teil), Methylgruppendonor:

(¹⁴C-Methyl-)Ado-Met

(x—x) = 30 mmol Cadaverin + tRNA^{f.Met} aus E.coli

(o—o) = 10 mmol Mg⁺⁺ + tRNA^{f.Met} aus E.coli

(●—●) = Proteinmethylierung mit 30 mmol Cadaverin
oder mit 10 mmol Mg⁺⁺

Um die Methylasepräparationen mit der höchsten Aktivierbarkeit zu erhalten, wurden die Hydroxylapatit-Fraktionen mit Cadaverin getestet (91). Wie Abbildung 18 zeigt, sind zwischen den Testergebnissen mit Mg^{++} und mit Cadaverin im wesentlichen nur quantitative Unterschiede zu sehen. Die Lage der Aktivitätspicks ist nicht verschoben. Die Methylasepräparationen I und II wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Zur Ermittlung der optimalen Polyaminkonzentrationen (für Cadaverin siehe Abb. 19) wurden Enzymkinetiken

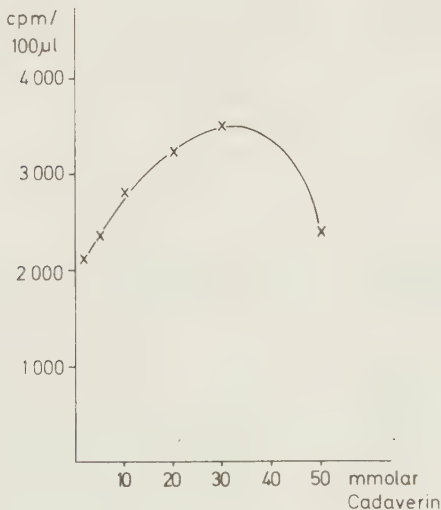


Abb.19

Stimulierung der tRNA-Methylierung in Abhängigkeit von der Konzentration (2.1h im Exp. Teil)

Methylgruppendonator: (^{14}C -Methyl-)Ado-Met

cpm = an tRNA gebundene ^{14}C -Methylgruppen

mit ansteigenden Konzentrationen durchgeführt. Der Methylierungsgrad im Plateau (für 30 mmol Cadaverin siehe Abb. 20) wurde zu diesem Zweck gegen die Konzentration aufgetragen. Folgende Konzentrationen brachten maximale Methylierung:

Cadaverin: 30 mmolar
 Putrescin: 30 mmolar
 Spermidin: 0,1 mmolar
 Spermin : 0,05 mmolar

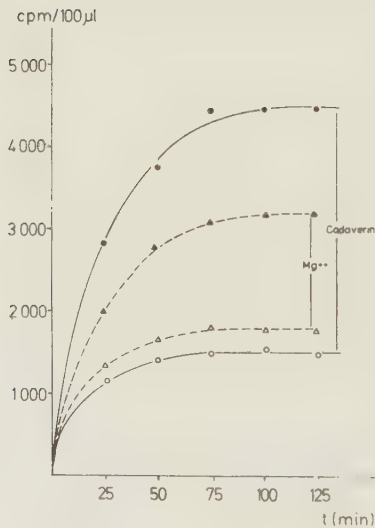


Abb. 20

Methylierungskinetik mit Mg^{++} bzw. Cadaverin
 (2,1h im Exp. Teil)

Methylgruppendonator: (^{14}C -Methyl-)Ado-Met

cpm = an tRNA bzw. Protein gebundene (^{14}C -Methyl-)Gruppen
 (○—○) } ohne tRNA = Protein (●—●) } mit tRNA^{f.Met}_{E.coli}
 (△---△) } (▲---▲) }

Die folgenden Versuche wurden mit Cadaverin durchgeführt. Wie aus Abbildung 20 ersehen werden kann, ist die Protein-Methylierung mit Mg^{++} und Cadaverin nicht wesentlich verschieden. Die tRNA-Methylierung wird jedoch auf mehr als das Doppelte der Werte mit Mg^{++} erhöht. Wenn man annimmt, daß der Einbau mit Mg^{++} einer Methylgruppe entspricht (etwa 1.700 cpm entsprechen einer Methylgruppe), dann sollten mit Cadaverin 1 - 2 Methylgruppen mehr eingebaut werden.

Die Stimulierung der tRNA-Methylierung ist spezifisch für biogene Diamine oder Polyamine. Versuche mit einem aliphatischen Monoamin, n-Butylamin, sowie mit aromatischen biogenen Monoaminen, Tyramin, Dopamin, Nor-Adrenalin, in entsprechenden Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die tRNA-Methylierung.

a. Methylierung von $tRNA_{E.coli}^{f.Met}$ in Gegenwart von 1 mmolar oder 10 mmolar Mg^{++}

$tRNA_{E.coli}^{f.Met}$ wurde wie im experimentellen Teil beschrieben im präparativen Maßstab mit (^{14}C -Methyl-)S-Adenosylmethionin methyliert und das Methylierungsprodukt danach aus dem Ansatz isoliert.

Durch Spaltung mit RNase T_1 und Säulenchromatographie wurde ein ^{14}C -Methyl-markiertes Oligonukleotid (I, Abb.22D) im Bereich der Tetranukleotide erhalten, während Spaltung mit RNase A aus Rinderpankreas ein markiertes Oligonukleotid bei den Dinukleotiden (I, Abb.21A) ergab. Inkubation mit RNase T_2 und Dephosphorylierung mit Phosphomonoesterase ergab ein ^{14}C -Nukleosid, welches durch Dünnschichtchromatographie als N^2 -Methyl-Guanosin identifiziert wurde (Abb.23B).

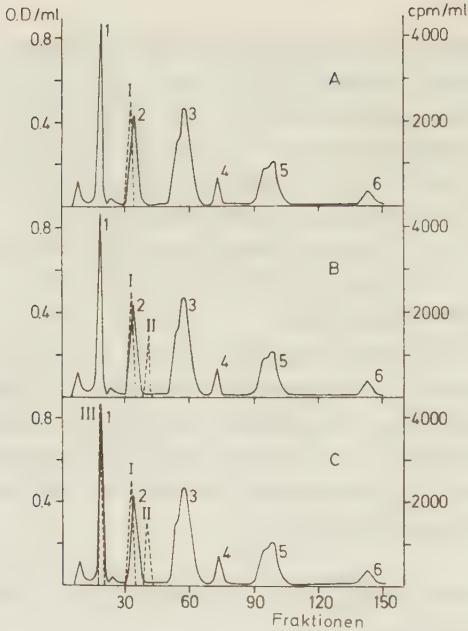


Abb. 21

Säulenchromatographie der RNase A-Spaltung der in vitro mit (^{14}C -Methyl-)Ado-Met und Methylase II methylierten $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$, (—) = O.D. 260nm, (----) = cpm/ml

A: Methylierung in 1 oder 10 mmolar Mg^{++}

B: Methylierung in 1 mmolar Mg^{++} und 30 mmolar Cadaverin

C: Methylierung in 30 mmolar Cadaverin
(4.1 im Exp. Teil)

Die einzelnen Peaks enthalten folgende Oligonukleotide (92,93):

1 = Cp, Up, Ψ p

2 = G-Cp, G-Up, A-Up

3 = pCp, A-G-Cp, A-A-Cp, G-G-Dp, G-G-Cp, G-G-rTp

4 = A-A-A-Up

5 = G-G-A-G-Cp, G-G-G-Cm-Up, G-A-A-G- m^2 G-Up

6 = G-G-G-G- s^4 Up

I = m^2 G-Up

II = A- m^1 A-A-Up

III = m^5 Cp

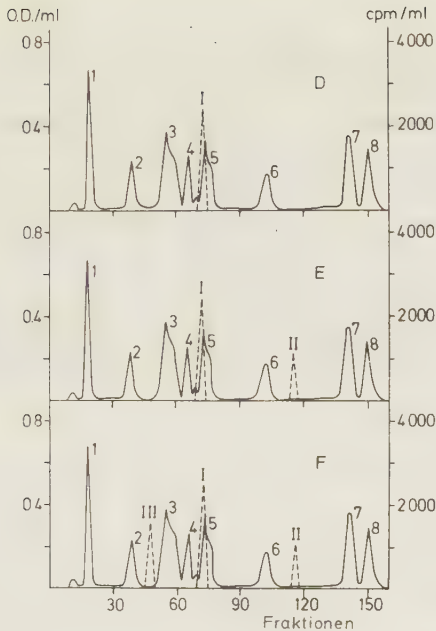


Abb. 22

Säulenchromatographie der RNase T_1 -Spaltung der in vitro mit (^{14}C -Methyl-)Ado-Met und Methylase II methylierten $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$, (—) = O.D. 260nm, (----) = cpm/ml

D: Methylierung in 1 oder 10 mmolar Mg^{++}

E: Methylierung in 1 mmolar Mg^{++} und 30 mmolar Cadaverin

F: Methylierung in 30 mmolar Cadaverin
(4.1 im Exp. Teil)

Die einzelnen Peaks enthalten folgende Oligonukleotide:

1 = Gp (92,93)

2 = C-Gp, A-Gp

3 = $m^7\text{G}$ -U-C-Gp, U-C-Gp, D-A-Gp, A-A-Gp, C-A-Gp

4 = C-A-A-C-C-A_{OH}

5 = $s^4\text{U}$ -Gp, C-U-C-Gp, C-C-U-Gp, pC-Gp

6 = C-C-C-C-C-Gp

7 = rT- Ψ -C-A-A-A-U-C-C-Gp

8 = Cm-U-C-A-U-A-A-C-C-C-Gp

I = C-U-C- $m^2\text{Gp}$

II = T- Ψ -C-A- $m^1\text{A}$ -A-U-C-C-Gp

III = $m^7\text{G}$ -U- $m^5\text{C}$ -Gp

Peak 5 (Abb.22) des RNase T_1 -Spaltmusters enthält zwei Tetranukleotide: C-C-U-Gp und C-U-C-Gp (21,92,93). Nur wenn in der Sequenz der tRNA auf das Guanosin ein Pyrimidin folgt, kann das Guanosin im RNase A-Spaltmuster Bestandteil eines Dinukleotids sein. C-C-U-Gp ist im Dihydrouridin-Loop lokalisiert, das folgende Nukleotid ist ein Gp (Abb.24). C-U-C-Gp ist im Dihydro-U-Stamm lokalisiert, auf das Guanosin folgt ein Up, bei dem die RNase A spalten kann. Es gibt in der tRNA^{f.Met}_{E.coli} keinen anderen Guanosinrest, der nach T_1 -Spaltung

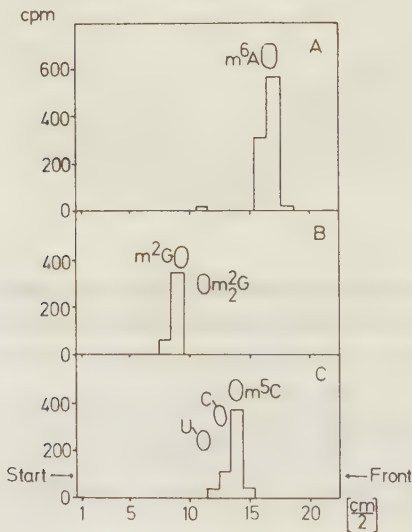


Abb. 23
Dünnschichtchromatographie der ^{14}C -Methyl-markierten methylierten Nukleoside (4.3 im Exp. Teil)
Die authentischen Vergleichssubstanzen wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht. Laufmittel: D (5.1b im Exp. T.)

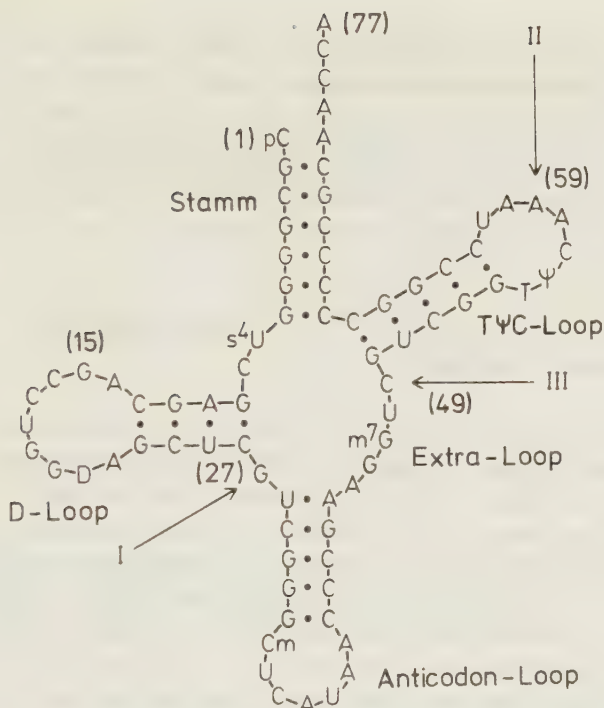


Abb. 24

Nukleotidsequenz von tRNA^{f.Met}_{E.coli} (92,93,94)

Die Pfeile bezeichnen die Stellen der Methylierung mit Rattenleber-Methylase:

I : m²G entsteht in Gegenwart von Mg⁺⁺

II : m¹A zusätzlich zu I in Gegenwart von Mg⁺⁺ und Cadaverin

III: m⁵C zusätzlich zu I und II in Gegenwart von Cadaverin

Bestandteil eines Tetranukleotids und nach RNase A-Spaltung Bestandteil eines Dinukleotids ist.

Durch den Nachweis der Identität des isolierten ^{14}C -Methyl-Nukleosids mit N^2 -Methyl-Guanosin und durch diese Überlegungen ist bewiesen, daß das Guanosin in Position 27 zu N^2 -Methyl-Guanosin methyliert wurde (Abb. 24).

b. Methylierung von $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ in 1 mmolar Mg^{++} und 30 mmolar Cadaverin.

Zusätzlich zu dem in Position 27 methyliertem Guanosin wurde ein zweites ^{14}C -Methyl-markiertes Oligonukleotid gefunden und zwar Peak II, im RNase T_1 -Spaltmuster zwischen den Hexa- (Abb.22E, Peak 6) und Dekanukleotiden (Abb.22E, Peak 7), im RNase A-Spaltmuster zwischen den Di- (Abb.21B, Peak 2) und Trinukleotiden (Abb.21B, Peak 3). Dünnschichtchromatographie der Peaks in verschiedenen Laufmitteln nach RNase T_2 - und Phosphatasebehandlung zeigte die Identität dieses markierten Nucleosids mit authentischem 1-Methyl-Adenosin.

DEAE-Sephadex A-25, das verwendete Säulenmaterial, trennt Oligonukleotide bevorzugt nach ihren negativen Ladungen, die von der Anzahl der Phosphatgruppen im Molekül bestimmt werden. 1-Methyl-Adenosin trägt durch die Methylierung des Ringstickstoffes eine positive Ladung. Dadurch verhält sich das entsprechende Oligonukleotid (Peak II der RNase A-Spaltung, Abb.21B) bei der Säulenchromatographie wie ein um einen Nukleotidbaustein verkürztes Oligonukleotid und wird in der Gegend der Trinukleotide eluiert, obwohl es ein Tetranukleotid ist.

Zur Beweisführung wurden die ^{14}C -Methyl-markierten Oligonukleotide (Peak II der Abb.21B und 22E) 1,5 Stunden in schwach alkalischer Lösung erhitzt. Dabei findet eine Umlagerung des 1-Methyl-Adenosin in N^6 -Methyl-Adenosin statt (95, Abb.25).

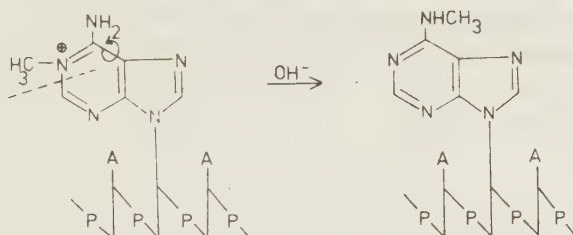


Abb. 25
Dimroth-Umlagerung von m^1A zu m^6A (95). Unter dem Einfluß von Alkali kommt es zu Ringöffnung, Rotation und Recyclisierung zu m^6A (96,97).

Die nun die Methylgruppe tragende Aminogruppe in 6-Stellung besitzt keine positive Ladung mehr. Säulenchromatographie der alkalibehandelten, methylierten Oligonukleotide mit den optischen Markern Peak 3 und 4 der RNase A-Spaltung und Peak 6,7 und 8 der RNase T_1 -Spaltung zeigte, daß der Peak II der RNase T_1 -Spaltung jetzt mit dem Dekanukleotid T- Ψ -C-A-A-A-U-C-C-Gp (Abb.22E, Peak 7) und Peak II der RNase A-Spaltung mit dem Tetranukleotid A-A-A-Up (Abb.21B, Peak 4) eluiert wird.

Damit ist bewiesen, daß ein Adenosin der Sequenz -A-A-A- im T Ψ C-Loop methyliert worden ist (Abb. 24).

Um herauszufinden, welches der drei Adenosinreste methyliert worden ist, wurde das endständige Phosphat des durch Alkalibehandlung erhaltenen Tetranukleotids $m^6(A-A-A-)Up$ (4.3b im Exp. Teil) mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Als optischer Marker und als "Carrier" für die folgenden Reaktionen wurden 5 O.D._{260nm} Einheiten A-A-A-A zugegeben. Durch Behandlung mit Perjodat und Cyclohexylamin wurde $m^6(A-A-A-)U$ (bzw. A-A-A-A) zu $m^6(A-A-A)p$ (bzw. A-A-Ap) abgebaut (98,99, Abb.26).

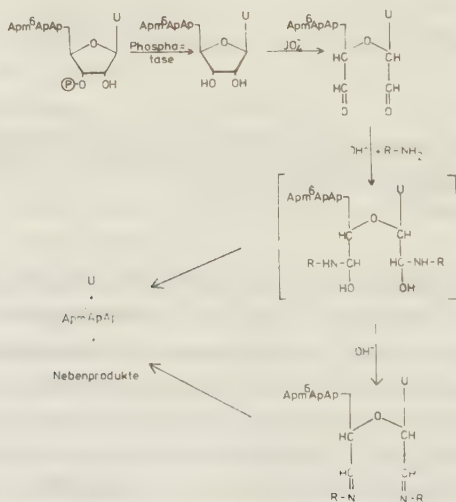


Abb. 26

Whitfield Abbau (98):

Nach Hydrolyse des Phosphats wird die Ribose zum Dialdehyd oxidiert. Mit einem primären Amin (R = Cyclohexyl-) wird über unstabiles Di- α -hydroxyaminderivat eine Schiff-sche Base gebildet, die durch β -Eliminierung zerfällt (99)

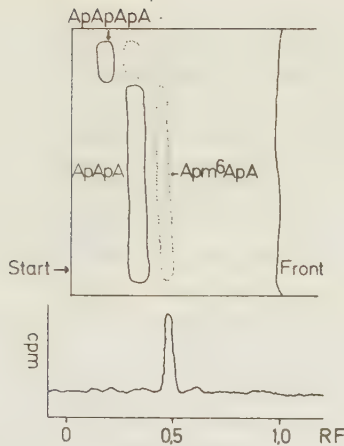


Abb. 27

Dünnschichtchromatographie zur Reinigung von $m^6(A-A-A)$, die Radioaktivität wurde mit dem Dünnschichtscanner lokalisiert, authentische Vergleichssubstanzen durch UV-Licht sichtbar gemacht (4.3b im Exp. Teil).
Laufmittel: E (5.1c im Exp. Teil)

$m^6(A-A-A)p$ wurde enzymatisch dephosphoryliert und zur Abtrennung der Phosphatase durch Zellulose-Dünnschichtchromatographie gereinigt (Abb. 27). Diese Abbildung zeigt auch, daß der Perjodat-Cyclohexylamin-Abbau quantitativ erfolgte, denn der optische Marker läuft nach dieser Behandlung nicht identisch mit der ursprünglichen Verbindung A-A-A-A.

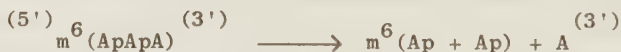
Nach gemeinsamer Eluierung des radioaktiv markierten $m^6(A-A-A)$ mit dem optischen Marker A-A-A wurden der Lösung 3 Teile entnommen und diese auf folgende Weise behandelt:

- 1.) Der erste Teil wurde mit RNase T₂ und Phosphatase behandelt. Dünnschichtchromatographie zeigte, daß die Radioaktivität den gleichen Rf-Wert wie die Testsubstanz N⁶-Methyl-Adenosin hatte (Abb.28A).
- 2.) Durch Inkubation mit Schlangengift-Phosphodiesterase wurde das Trinukleotid in zwei Nukleotid-5'-phosphate und ein Nukleosid vom 5'-Ende gespalten:



Dünnschichtchromatographie in einem Laufmittel, das Nukleoside von Nukleotiden trennt, zeigte, daß die Radioaktivität bei den Nukleotiden lokalisiert ist und nicht bei dem als Testsubstanz aufgetragenem Nukleosid N⁶-Methyl-Adenosin (Abb.28B). Dies beweist, daß nicht das Adenosin am 5'-Ende, sondern das zentrale oder das 3'-terminale Adenosin methyliert worden war.

- 3.) Spaltung mit Milz-Phosphodiesterase ergab zwei Nukleotid-3'-phosphate und ein Nukleosid vom 3'-Ende:



Dünnschichtchromatographie wie unter 2.) zeigte, daß die Aktivität nicht mit der Testsubstanz N⁶-Methyl-Adenosin läuft (Abb.28C).

Dies beweist, daß das Adenosin am 3'-Ende nicht methyliert wurde und nur das zentrale Adenosin der A-A-A-Sequenz die Methylgruppe tragen kann.

Die Bildung von Adenosin bei beiden Reaktionen (Abb.28B,C) zeigt, daß die enzymatischen Spaltungen gelungen sind.

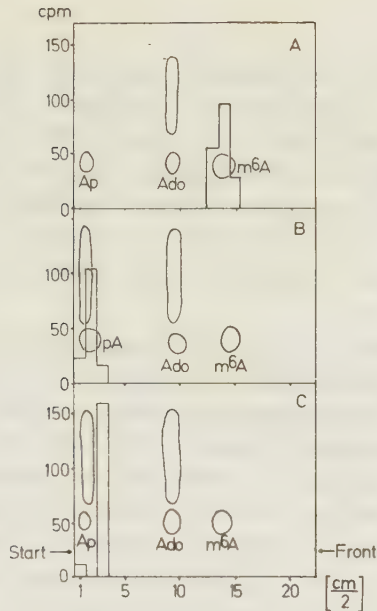


Abb. 28

Dünnschichtchromatographie der enzymatischen Spaltungen

von m⁶(A-A-A) (4.3b im Exp. Teil)

A: Spaltung mit RNase T₂ und Phosphatase

B: Spaltung mit Schlangengift-Phosphodiesterase

C: Spaltung mit Milz-Phosphodiesterase

Laufmittel: D (5.1b im Exp. Teil), die Vergleichssubstanzen wurden durch UV-Licht sichtbar gemacht. Ado = Adenosin

Da die beiden verwendeten Exonukleasen etwas Phosphatase enthalten, wurde zum Inkubationsansatz 0,001 m Kaliumphosphat zur Phosphatasehemmung gegeben. Aus demselben Grund wurde die Inkubationszeit so kurz wie möglich gehalten und die Substratmenge durch Zusatz des A-A-A-A vergrößert.

Durch diesen Abbau ist bewiesen, daß unter den Versuchsbedingungen mit 1 mmolar Mg^{++} und 30 mmolar Cadaverin zusätzlich zur Methylierung des Guanosin in Position 27 der tRNA das Adenosin im T Ψ C-Loop in Position 59 zu 1-Methyl-Adenosin methyliert wurde (Abb. 24).

c. Methylierung von tRNA^{f.Met}_{E.coli} in 30 mmolar Cadaverin

Zusätzlich zu Peak I, der das N²-Methyl-Guanosin in Position 27 der tRNA enthält und zum Peak II, in dem das Adenosin in Position 59 zu 1-Methyl-Adenosin methyliert ist, wurde ein radioaktiv markierter Peak III gefunden. Im Spaltmuster der RNase A wurde bei den Mononukleotiden (Abb.21C), in dem der RNase T₁ zwischen den Di- und Trinukleotiden Radioaktivität nachgewiesen (Abb.22F). Nach dem Abbau mit RNase T₂ und Phosphatase des Oligonukleotids aus Peak III der RNase T₁-Spaltung (Abb.22F) und nach Phosphatasebehandlung der Mononukleotide aus Peak I der RNase A-Spaltung (Abb.21C) zu Nukleosiden konnte mittels Dünnschichtchromatographie das ¹⁴C-markierte Methylnukleosid als 5-Methyl-Cytidin identifiziert werden (Abb.23C).

Die Elution des Peaks III in der Nähe der Trinukleotide der RNase T₁-Spaltung (Abb.22F) deutet darauf hin, daß links vom 5-Methylcytidin ein Pyrimidin stehen muß, da es bei der RNase A-Spaltung mit den Mononukleotiden eluiert wird. Das 5-Methyl-Cytidin muß also Bestandteil einer Pyr-m⁵C-Gp Sequenz sein. Drei solche Sequenzen sind in tRNA^{f.Met}_{E.coli} vorhanden: -U-C-G- im Anticodonstamm, -U-C-G- im T Ψ C-Stamm, ferner -m⁷G-U-C-G- im Extraloop, ein Tetranukleotid, welches nach RNase T₁-Spaltung wegen der positiven Ladung des m⁷G etwa bei den Trinukleotiden eluiert wird. tRNAs von höheren Lebewesen (Hefe, Ratten-

leber) besitzen zwischen TΨC-Loop und Extraloop 5-Methyl-Cytidin (100). Deshalb lag die Vermutung nahe, daß die Methylierung in der m⁷G-U-C-G-Sequenz stattgefunden hatte. Zur Beweisführung wurde das Fragment mit Alkali behandelt, um die positive Ladung des 7-Methyl-Guanosins zu zerstören (101, Abb.29).

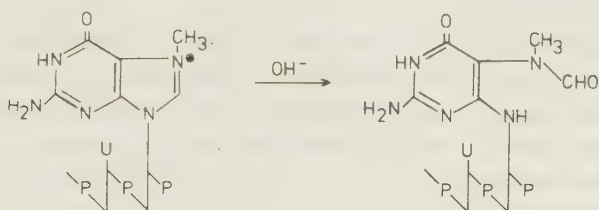


Abb. 29
Alkali-katalysierte Ringöffnung von 7-Methyl-Guanosin
zum 4-Ribosylamino-pyrimidin-derivat (101)

Säulenchromatographie mit den Oligonukleotiden aus Peak 3 und 4 als optische Marker zeigte nun die Elution des radioaktiv markierten Oligonukleotids bei den Tetranukleotiden (Peak 4 der Abb.22F).

Damit ist gezeigt, daß in 30 mmolar Cadaverin eine dritte Methylgruppe auf das Cytidin in Position 49 der tRNA^{f.Met}_{E.coli} übertragen wird. Das resultierende Nukleosid ist 5-Methyl-Cytidin (Abb. 24).

Diese Ergebnisse wurden im wesentlichen mit Methylase I ebenso wie mit Methylase II erhalten.

Beide Methylasepräparationen enthalten also mindestens drei tRNA-Methylasen mit verschiedener Spezifität:

m^2G - Methylase, m^1A - Methylase und m^5C - Methylase. Die im Vergleich zu G^{27} und C^{49} geringere Methylierung von A^{59} (Abb.21B,C, 22E,F) könnte zwei Gründe haben:

1. Die m^1A - Methylase liegt im Methylasegemisch in geringerer Menge vor. Dies konnten auch Nishimura und Mitarbeiter (102) in einer Methylase II-Präparation nachweisen.
2. Da transfer-Ribonukleinsäuren in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen können (103,104). die nicht oder nur langsam ineinander übergehen, besteht auch die Möglichkeit, daß die tRNA zum Teil in einer Konformation vorliegt, die nicht mit m^1A - Methylase reagieren kann.

Versuche, die basenspezifischen Methylierungsaktivitäten zu trennen, blieben erfolglos:

Gelfiltration an Biogel P 200 (Abb. 30) eluierte die Aktivität in einem einzigen Peak. Die einzelnen Methylasen scheinen demnach ähnliche Molekulargewichte und physikalische Eigenschaften zu besitzen.

Fraktionierung der Methylasepräparation durch Säulenchromatographie am Anionenaustauscher DEAE-Zellulose, sowie am Kationenaustauscher Phosphozellulose scheiterte, da durch große Aktivitätsverluste keine Auftrennung möglich war (ohne Abb.).

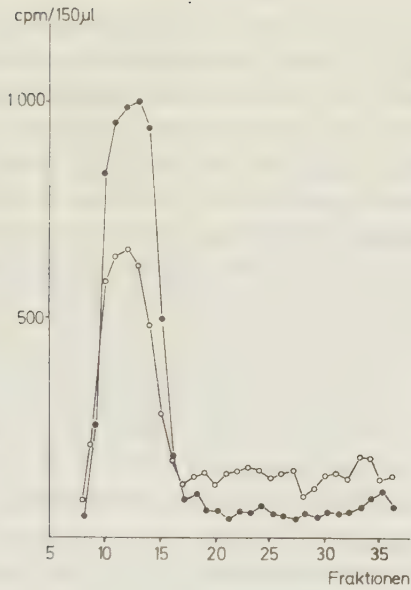


Abb. 30

Gelfiltration einer Methylase II - Präparation

Elutionsmittel: Puffer A (2.1g im Exp. Teil)

Methylgruppendonor: (¹⁴C-Methyl-)Ado-Met

(○—○) = tRNA^{f.Met}_{E.coli} mit Mg⁺⁺

(●—●) = tRNA^{f.Met}_{E.coli} mit Cadaverin

Leboy (105) und Pegg (106) beschrieben bei Methylierungsversuchen in vitro in Gegenwart von Polyaminen das Auftreten von neuen methylierten Basen bei unfractionierter tRNA aus E. coli. Pegg (106) beschrieb in einer Kurzmitteilung, daß in tRNA^{f.Met}_{E.coli} zusätzlich zu Guanosin in Position 27 auch Cytidin, vermutlich in Position 49, und das Adenosin in Position 59 methyliert werden kann. Er gab jedoch keine experimentellen Details an und beobachtete nicht die in dieser Arbeit erstmals gezeigte stufenweise enzymatische Methylierung einer tRNA. Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Identifizierung der methylierten Nukleoside und die Bestimmung ihrer Position in der tRNA^{f.Met}_{E.coli} - Sequenz wurde eine der Schwierigkeit der Aufgabe angepaßte Kombination von bekannten Methoden angewendet.

Young und Srinivasan (107) fanden einen Antagonismus zwischen Mg^{++} und Polyaminen bei der in vitro - Methylierung von unfractionierter tRNA aus E. coli, ohne zu untersuchen, welche Basen methyliert wurden. Sie vermuteten durch Bindung der Polyamine an die tRNA eine Beeinflussung der Konfiguration, die eine höhere Methylierung begünstigt (107).

Mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen konnte eine stufenweise Methylierung der tRNA^{f.Met}_{E.coli} mit Cadaverin durch Verdrängung der Magnesiumionen erstmals gezeigt werden.

Damit bleibt die Frage zu untersuchen, wodurch die verschiedenen Methylierungsstufen von $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ unter diesen Versuchsbedingungen zustandekommen. Zwei Möglichkeiten stehen zur Diskussion:

- a. $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ erfährt durch Nukleasespaltung eine Konformationsänderung. In den Methylasepräparationen sind geringe Mengen an Nukleasen enthalten.
- b. $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ liegt unter den Versuchsbedingungen (1 oder 10 mmol Mg^{++} , 1 mmol Mg^{++} und 30 mmol Cadaverin, bzw. 30 mmol Cadaverin ohne Mg^{++}), entsprechend den drei Methylierungsmustern (Abb.24, Seite 45) in drei verschiedenen Konformationen vor.

Beide Möglichkeiten wurden überprüft:

zu a.) Von Kuchino et al. (102) wurde beschrieben, daß eine m^1A - Methylase das Adenosin in Position 59 in $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ - Fragmenten methylieren kann. In Gegenwart von Cadaverin könnten durch Einwirkung von Nukleasen, die in der Methylasepräparation enthalten sind, Fragmente entstehen, die durch eine von der intakten tRNA abweichenden Konformation für eine m^1A - Methylase und eine m^5C - Methylase bessere Substrate sind.

Durch folgende Überlegungen und Versuche kann eine Nukleaseeinwirkung ausgeschlossen werden:

1. Wenn Nukleasen wirksam wären, müßte bei längerer Inkubation säureunlösliches Material löslich werden. Die Methylierungskinetiken mit Cadaverin bleiben jedoch wie in Gegenwart von Mg^{++} auf einem Plateau stehen (Abb.20, Seite 40).

2. Die Chromatographie der RNase A- und T_1 -Spaltungen bestanden aus einheitlichen, intakten Fragmenten. Die Auswirkungen zusätzlicher Nukleasen würde sich in einem veränderten Spaltmuster zeigen (Abb.21,22, Seite 42,43).
3. Polyacrylamidelektrophorese von in Gegenwart von Mg^{++} bzw. Cadaverin methylierter tRNA in 6 molar Harnstoff zeigte intakte methylierte tRNA^{f.Met}_{E.coli}.

zu b.) Durch Bestimmung der differenzierten Schmelzkurven der tRNA bei den Bedingungen, unter denen eine, zwei oder drei Methylgruppen eingebaut werden, also in 1 und 10 mmolar Mg^{++} , 1 mmolar Mg^{++} und 30 mmolar Cadaverin, bzw. in 30 mmolar Cadaverin, wurde versucht, Konformationsunterschiede der tRNA zu erkennen und diese in Beziehung zu den Methylierungsergebnissen zu setzen.

Diese Versuche wurden von Dr. D. Riesner, Gesellschaft für molekularbiologische Forschung GMBH, Stöckheim (jetzt medizinische Hochschule, Hannover) durchgeführt (91).

Folgendermaßen können die Aussagen der differenzierten Schmelzkurven mit den Methylierungsergebnissen in Beziehung gesetzt werden:

1. Mit 10 mmolar (oder 1 mmolar) Mg^{++} ist die Tertiärstruktur bei $37^{\circ}C$ dicht gepackt, methyliert werden kann nur das Guanosin in Position 27 (Abb.24, Seite 45). Öffnen der Tertiärstruktur und Sekundärstruktur (gleichzeitig) tritt mit Mg^{++} erst bei etwa $75^{\circ}C$ ein.

2. Mit 1 mmolar Mg^{++} und 30 mmolar Cadaverin wird die durch Mg^{++} stabilisierte Tertiärstruktur destabilisiert. Das Öffnen der Tertiärstruktur tritt jetzt bei 60°C ein.

Es ist bekannt, daß die Tertiärstruktur in zwei Schritten aufgefalted wird (108,109). Bei dem hier vorliegendem ersten Schritt ist nur das Adenosin in Position 59 (Abb.24, Seite 45) der T Ψ C - Schleife methylierbar, während das Cytidin in Position 49 im Extraloop noch blockiert ist.

3. Mit 30 mmolar Cadaverin ist die Tertiärstruktur hauptsächlich aufgefalted. Bereits bei 35°C, das heißt, unter Methylierungsbedingungen, liegt ein Teil der tRNA - Moleküle in der Kleeblattstruktur, ohne Tertiärfaltung vor. T Ψ C - Schleife und Extraloop sind frei. Deshalb kann zusätzlich zum Guanosin in Position 27 das Adenosin in Position 59 und das Cytidin in Position 49 (Abb.24, Seite 45) methyliert werden.

Wie unter 2.) festgestellt wurde, sind am Aufschmelzen der tRNA - Tertiärstruktur zwei Prozesse gleichzeitig beteiligt (biphasisches Schmelzen der Tertiärstruktur, 108,109). Die Natur dieses Schmelzvorgangs und die Reihenfolge der beiden Schmelzprozesse ist noch nicht vollständig verstanden (110). Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche zur tRNA - Methylierung erlauben jedoch in Verbindung mit den differenzierten Schmelzkurven einige Aussagen über diese Vorgänge.

Cadaverin öffnet die tRNA - Tertiärstruktur (Abb.2, Seite 3 und Abb.24, Seite 45) schrittweise.

In Gegenwart von Mg^{++} und Cadaverin wird Methylierung nur am Adenosin in Position 59 und nicht am Cytidin in Position 49 gefunden. Daraus darf geschlossen werden, daß der erste Teil des Tertiärstrukturschmelzens in einem Herausnehmen des T Ψ C - Loops aus der Tertiärstruktur besteht. Das Fehlen einer Cytidin - Methylierung in Position 49 unter diesen Bedingungen spricht für die im Levitt - Modell (Abb.31, 111) geforderte $G^{15} - C^{49}$ - Wechselwirkung, die auch von Cashmore (112,113) durch Bestimmung der chemischen Reaktivität von Cytidin in Position 49 wahrscheinlich gemacht wurde und steht nicht im Widerspruch zu den Vorstellungen von Rich et al. (Abb.2).

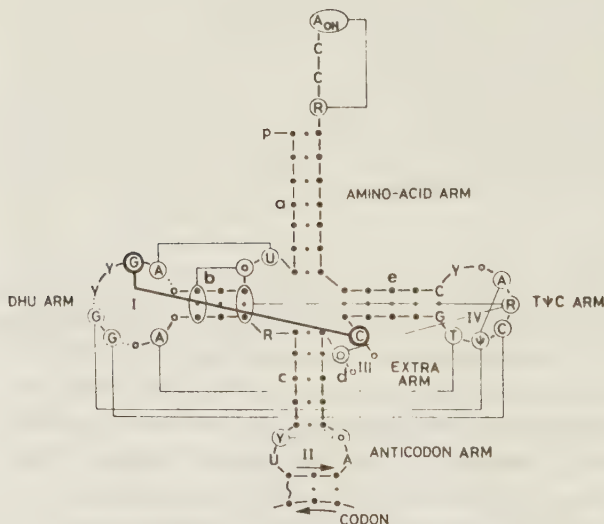


Abb. 31

tRNA - Modell aus M. Levitt, Nature 224, 759, (1969)
In dem Modell wird im wesentlichen eine Wechselwirkung zwischen D-Loop und T Ψ C-Loop, sowie zwischen

G^{15} und C^{49} postuliert. Nur diejenigen Nukleotide sind bezeichnet, welche in allen bisher sequenzierten tRNAs in derselben Position auftreten.

Die $G^{15} - C^{49}$ - Wechselwirkung ist in der Zeichnung verstärkt.

Die Vorstellung, daß biogene Diamine und Polyamine in vitro zunächst den TΨC - Loop zugänglich machen, erlaubt es, eine Hypothese über ihre Funktion in vivo aufzustellen:

Da biogene Diamine und Polyamine ein Bestandteil prokaryontischer und eukaryontischer Ribosomen sind (114,115), könnte ihre Funktion am Ribosom darin bestehen, daß sie bei der Proteinbiosynthese durch Beeinflußung der Aminoacyl - tRNA - Struktur die Wechselwirkungen zwischen dem TΨC - Loop (Ribosomenbindungsort) der tRNA und dem Ribosom möglich machen.

Diese Substrataktivierung durch Diamine und Polyamine ist nicht die einzige Verbindung zwischen Polyaminen und tRNA - Methylierung. Ein interessanter Zusammenhang besteht in der gemeinsamen Verwendung von S-Adenosylmethionin in vivo sowohl für enzymatische Methylierungen als auch für die Biosynthese der Polyamine Spermin und Spermidin (116,117). Wie in Abbildung 32 aufgezeichnet wurde, dient S-Adenosylmethionin einmal als Methylgruppenlieferant für die Methyltransferasen, in einer anderen Reaktion liefert es Propylaminogruppen, die auf Putrescin übertragen werden. Dabei entstehen Spermidin und Spermin. Diese Stoffwechselprodukte von basischen Aminosäuren, über deren Bedeutung im Stoffwechselgeschehen keine Klarheit besteht, greifen wieder in die Methylierungsreaktion ein, indem sie das Substrat tRNA aktivieren. Eine Beteiligung der biogenen Amine an der tRNA - Methylierung in vivo erscheint möglich, ist jedoch nicht erwiesen.

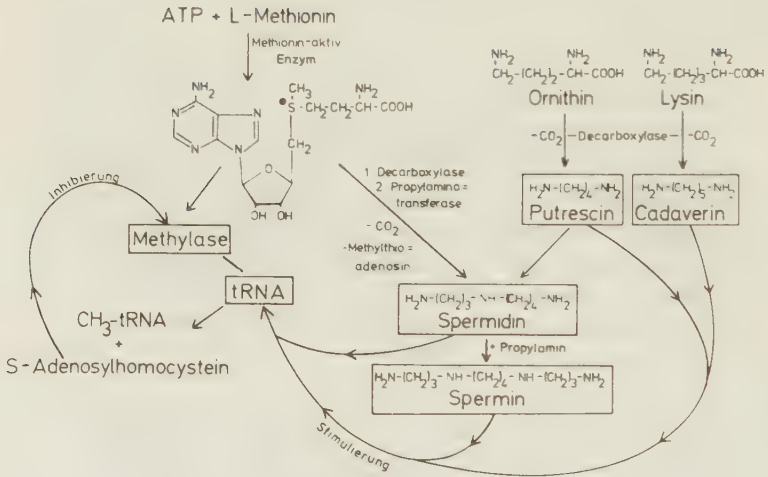


Abb. 32

S-Adenosylmethionin und seine Bedeutung für
tRNA - Methylierung und Polyaminbiosynthese

Eine Konformationsänderung der tRNA durch Polyamine ist auch für die Aminoacylierung der tRNA von Bedeutung. Diese Reaktion wird durch Spermin stimuliert (89,90). Igarashi (90) konnte nachweisen, daß Spermin an die tRNA bindet und nicht an das Enzym. Auch bei diesem Vorgang scheint das Substrat aktiviert zu werden und nicht das Enzym.

Der Reaktionsmechanismus der in dieser Arbeit beschriebenen Wirkung der biogenen Amine auf die enzymatische Methylierung könnte folgendermaßen beschrieben werden:

Die biogenen Diamine und Polyamine verändern als "allosterischer Effektor" die Struktur des "allosterischen Substrats" tRNA, ohne direkt an der Methylierung beteiligt zu sein.

5. Homologe Methylierung von tRNA^{Valin} aus Kaninchenleber

Aus einer im Methionin-Mangelmedium gewachsenen Methionin-auxotrophen *E. coli* - Mutante isolierten Mandel und Borek (118) eine tRNA, die unvollständig methyliert war. Diese methyldefiziente tRNA ließ sich auch im homologen System mit einer Methylasepräparation aus *E. coli* und mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor methylieren (16). Homologe Methylierung von unfraktionierter Säuger-tRNA mit Enzympräparationen aus Normalgeweben (21, Abb.5, Seite 13) oder aus Tumoren mit erhöhter Methylierungsaktivität (68), oder

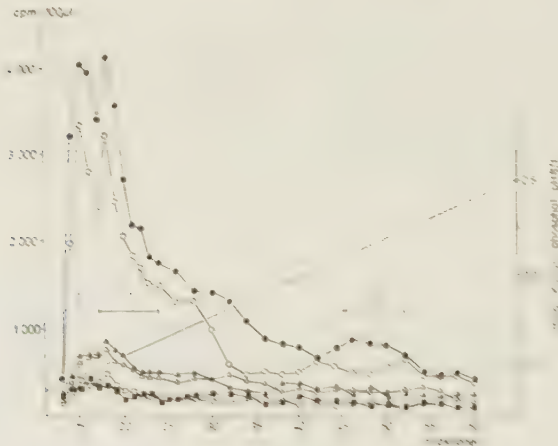


Abb. 33

Fraktionierung der Kaninchenleber-tRNA-Methylasen an Hydroxylapatit. Test auf Methylaseaktivität mit Cadaverin oder Mg^{++} und (^{14}C -Methyl-)Ado-Met als Methyl-donator. Die Fraktionen bei II und III wurden gesammelt.

(○—○) = Mg^{++} } tRNA^{f. Met} (Δ—Δ) = Mg^{++} } tRNA^{Valin}
 (●—●) = Cad. } tRNA^{E. coli} (▲—▲) = Cad. } tRNA^{K.L.}
 (■—■) = Cad. ohne tRNA (□—□) = Mg^{++} ohne tRNA

Methylierung im homologen System durch stimulierende in vitro-Bedingungen, z. B. Zusatz von Polyaminen (28) oder Ammoniumionen (31,33), zeigte entweder überhaupt keine oder nur sehr geringe Effekte.

Da in der Arbeitsgruppe reine, fraktionierte Kaninchenleber-tRNAs zur Verfügung stehen, wurde versucht, solche tRNAs mit Kaninchenleberenzym zu methylieren. Abbildung 33 zeigt, daß sowohl mit Mg^{++} als auch mit Cadaverinzusatz eine Methylierung der $tRNA_{K.L.}^{Valin}$ zu erreichen ist. Verglichen mit der heterologen Methylierung von $tRNA_{E.coli}^{f.Met}$ ist sie allerdings gering. Die

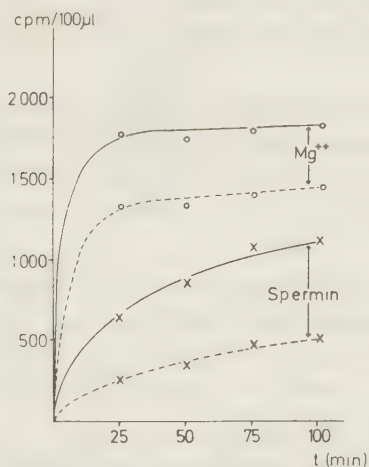


Abb. 34
Methylierung von $tRNA_{K.L.}^{Valin}$ (2.1h im Exp. Teil)

(x—x) = Methylase III mit $tRNA$ } mit Spermin
(x---x) = Methylase III, Protein }
(O—O) = Methylase II mit $tRNA$ } mit Mg^{++}
(O----O) = Methylase II, Protein }

Auftrennung der Methylierungsaktivität der Kaninchenleber (Abb.33) stimmt im wesentlichen mit der der Rattenleber überein (Abb.4, Seite 11).

Nach Isolierung der Methylaseaktivitäten zeigte sich unterschiedliches Verhalten der Methylasepräparationen II und III. Während bei Verwendung von Methylase II die höchste Stimulation der Methylierung von tRNA^{Valin}_{K.L.} überraschenderweise mit Mg^{++} erhalten wurde (mit Polyaminen war die Methylierung nicht stimulierbar), ist sie mit Methylase III nur in Anwesenheit von Spermin zu beobachten (Mg^{++} zeigte keine Stimulation) (Abb.34). Aus der eingesetzten Aktivität des (¹⁴C-Methyl-)S-Adenosylmethionins und der tRNA-Menge läßt sich berechnen, daß eine Methylgruppe auf jedes 10. - 12. tRNA-Molekül trifft.

RNase T₂ - Behandlung der methylierten tRNA und zweidimensionale Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie zeigte das Auftreten von mindestens 2 (Abb.35A), bzw. 4 (Abb.35B) verschiedener methylierter Nukleotide.

Bei diesen Versuchen wurden jeweils mindestens 3 verschiedene Basen methyliert. Auf Grund von früheren Bestimmungen können sie als methylierte Adenosin- und Guanosinderivate, sowie als 5-Methyl-Cytidin angesehen werden (Abb. 14, Seite 32).

Bemerkenswert ist das Auftreten von radioaktiv markiertem 5-Methyl-Cytidin beim Methylierungsansatz mit Spermin. Dieses Nukleosid ist in allen tRNA-Sequenzen, in denen es vorkommt an derselben Stelle, zwischen Extraloop und TΨC-Stamm zu finden (100).

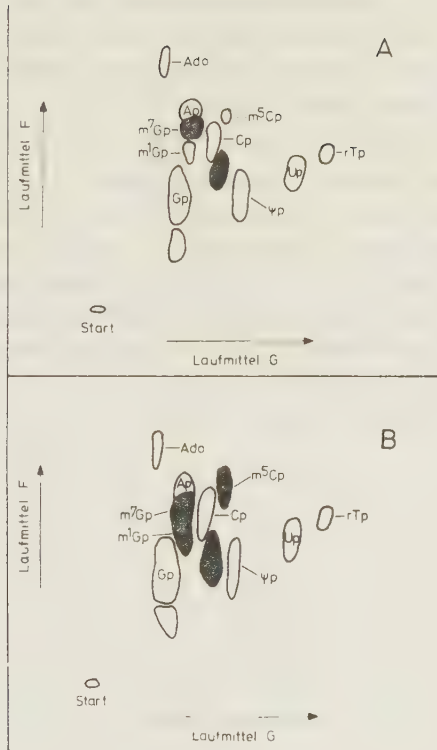


Abb. 35

Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie der RNase T₂-Spaltprodukte in vitro methylierter tRNA^{Valin}_{K.L.} (2.5a im Exp. Teil)

A: Methylierung mit Methylase II und Mg⁺⁺

B: Methylierung mit Methylase III und Spermin

Laufmittel siehe 5.1d im Exp. Teil

helle Flecke: im UV-Licht sichtbar (Ado = Adenosin)

dunkle Flecke: nach Autoradiographie sichtbar

Da eine eingebaute Methylgruppe auf etwa jedes 10. tRNA - Molekül trifft und da mindestens drei verschiedene methylierte Nukleotide gefunden werden, sollte dieselbe Base höchstens in jedem 30. - 50. tRNA - Molekül methyliert worden sein.

Alter, Rasse und Geschlecht der Kaninchen, aus denen die tRNA isoliert und die Methylase präpariert worden war, waren verschieden. Innerhalb der tRNA-Spezies oder der Methylasen könnten Unterschiede bestehen. Altersabhängige, unterschiedliche tRNA - Methylierung wurden von Wust und Rosen (119) in Ratten beschrieben.

C. Experimenteller Teil

1. Material und Geräte

1.1 Material

Radioaktive Verbindungen:

bei NEN Chemicals wurden gekauft: (^{14}C -Methyl-)S-Adenosylmethionin (spez. Akt. 54,6 Ci/Mol), (^{14}C -Äthyl-)L-Äthionin (spez. Akt. 4,13 Ci/Mol),

bei Amersham: (^{14}C -Carboxyl-)S-Adenosylmethionin (spez. Akt. 61 Ci/Mol),

Nukleoside und Nukleotide:

N^2 -Methyl- und N_2^6 -Dimethyl-Guanosin waren ein Geschenk von Dr. M. Saneyoshi, Tokyo,

bei Cyclo Chemicals wurden gekauft: 5-Methyl-Cytidin, 1-Methyl-, N^6 -Methyl- und N_2^6 -Dimethyl-Adenosin,

bei Boehringer, Mannheim: Adenosin, Adenosinphosphat, Guanosinphosphat, Uridinphosphat, S-Adenosylmethionin (nicht markiert), reduziertes Glutathion, L-Methionin, A-A-A-Ap,

L-Methioninsulfoxid und -sulfon wurden bei Cyclo Chemicals, INH, L-Äthionin, D-Äthionin bei Fluka AG, Nikotinamid und Zellulose-Fertigplatten mit und ohne Fluoreszenzindikator bei E. Merck AG erhalten.

1.2 Geräte

Zentrifugen: Ultrazentrifuge IEC B 60, MSE High Speed 18, Christ Minifuge,

Massenspektrometer: CH 7 der Firma Varian Mat,
Spektrometer: Gilford Modell 240, selbstregistrierend,
Szintillationsspektrometer: Packard Modell Tricarb 3380,
Dünnschicht Scraper der Firma Desaga, Heidelberg,
Dünnschicht Scanner für radioaktives Material der
Firma Berthold.

2. Enzyme

Sämtliche Enzympräparationen wurden bei 0°C durchgeführt.

2.1 tRNA-Methylasen (S-Adenosyl-L-methionin-tRNA-methyl- transferasen) (21,44)

a. Gewinnung eines mikrosomenfreien Überstands aus Rattenleber

15 g in flüssigen Stickstoff tiefgefrorene Rattenleber
wurde mit dem vierfachen Volumen Puffer, bestehend aus
0,25 m Saccharoselösung, 0,01 m Trispuffer pH 7,8,
0,01 m Magnesiumchloridlösung, 0,001 m β -Mercaptoäthanol
2 Minuten im Mixer (Fa Braun) homogenisiert. Das Homo-
genat wurde in der Ultrazentrifuge bei 100.000 x g eine
Stunde zentrifugiert.

b. Fraktionierung an Hydroxylapatit

Der UZ-Überstand wurde auf einer Hydroxylapatitsäule
(2,1cm x 16cm), äquilibriert mit Puffer A (0,01 m
Trispuffer pH 7,8, 0,01 m EDTAlösung pH 8,0, 0,001 m
 β -Mercaptoäthanol), aufgetragen. Die Säule wurde mit
ungefähr 150 ml Puffer A nachgewaschen (bis die Wasch-

flüssigkeit klar und die optische Dichte des Eluats bei 280nm zurückgegangen war) und mit einem linearen Phosphatgradienten von 0 - 0,5 m Kaliumphosphat: 200 ml Puffer A in der Mischkammer, 200 ml Puffer B (0,01 m Trispuffer pH 7,8, 0,01 m EDTALösung pH 8,0, 0,001 m β -Mercaptoäthanol, 0,5 m Kaliumphosphatpuffer pH 8,0) in der Vorratskammer eluiert.

c. Test auf Methylierungsaktivität

(Abb.4, S.11, Abb.18, S.38, Abb.33, S.64)

120 μ l Inkubationsvolumen enthielten: 50 μ l einer Hydroxylapatitsäulenfraktion, 1 μ M Magnesiumchlorid (oder 3 μ M Cadaverin), 10 μ M Tris pH 7,8, 1 μ M reduziertes Glutathion, 0,05 O.D._{260nm} Einheiten tRNA, 1,44 nM (¹⁴C-Methyl-)Ado-Met (spez. Akt. 13,9 Ci/Mol) Die Säulenfraktionen wurden jeweils mit tRNA_{E.coli}, tRNA_{f.Met}, tRNA_{E.coli}^{Valin}, bzw. ohne tRNA getestet. Zur Bestimmung der Stimulierung mit biogenen Aminen wurde Mg⁺⁺ durch Cadaverin ersetzt.

Nach einer Stunde Inkubation bei 35°C wurden 100 μ l - Anteile jedes Ansatzes auf Filterscheiben von ca 2 cm $\emptyset$ gegeben und diese dreimal je 10 Minuten in Trichlor-essigsäurelösung 5%, einmal in Äther/Äthanol 1:1 und einmal in Äther gewaschen (34). Die getrockneten Filter wurden je mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Toluol-Diphenyloxazol 6%) versetzt und im Szintillationsspektrometer gemessen.

d. Ammoniumsulfatfällung

Die Fraktionen mit der höchsten Methylierungsaktivität

wurden als Methylase I,II,III gesammelt, jeweils mit der dreifachen Menge bei 0°C gesättigter Ammonsulfatlösung (800 g Ammonsulfat in 1 Liter 0,05 m Trispuffer pH 7,8) versetzt, vom Niederschlag abzentrifugiert und dieser in wenig Dialysepuffer gelöst. Die Enzymlösung wurde gegen 2 Liter Dialysepuffer (0,01 m Tris pH 7,8, 0,01 m EDTA, 0,001 m β -Mercaptoäthanol, 50% Glycerin) 16 Stunden dialysiert. Die Enzyme wurden bei -20°C aufbewahrt.

e. Proteingehalt

Die Proteinmenge wurde nach Fällung mit 5% TCA-Lösung mit dem Biuretreagenz quantitativ bestimmt (120).

f. Unfraktionierte Methylase (72)

(Tab.2, S.30)

Für die Bestimmung der Methylierungsaktivität bei den Tierversuchen mit Äthionin wurde der mikrosomenfreie UZ-Überstand ohne vorhergehende Fraktionierung der Ammonsulfatfällung und Dialyse unterworfen. Die Aktivität wurde mit 50 μ l und 100 μ l des Dialysats nach dem Schema des Tests auf Methylierungsaktivität bestimmt.

g. Versuche zur weiteren Fraktionierung der Methylasen

Für diese drei Versuche wurden jeweils 1 ml einer Methylase II verwendet. Der Aktivitätstest wurde jeweils mit 3 μ M Cadaverin oder 1 μ M Mg^{++} unter Verwendung von $tRNA_{E.coli}^{f.Met}$ als Substrat durchgeführt, wie in 2.1c beschrieben.

Gelfiltration:

Als Säulenmaterial wurde Biogel P 200, eine Polyakrylamidverbindung mit einer Ausschlußgrenze für Makromoleküle von 200.000 Dalton verwendet. Säulengröße: 45 cm x 2 cm, Elutionsmittel: Puffer A (Abb.30, S.55).

DEAE-Zellulose:

DEAE-Zellulose ist ein schwacher Anionenaustauscher. Eine Säule von 30 cm Länge und 1,2 cm Ø und ein Gradient von 0 - 0,3 m NaCl in Puffer A wurde zur Elution verwendet (Elutionsvolumen: 300 ml).

Phosphozellulose:

Dieses Säulenmaterial besteht aus phosphorylierter Zellulose und wirkt als Kationenaustauscher. Gradient: 0 - 0,5 m NaCl in insgesamt 400 ml 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,8.

h. Kinetische Messungen an tRNA-Methylasen

(Abb.5, S.13, Abb.7, S.16, Abb.7,8, S.17, Abb.20, S.40, Abb.34, S.65)

Der Standardansatz enthielt in 120 µl Inkubationsvolumen: 1 µM Magnesiumchlorid, 10 µM Tris pH 7,8, 1 µM reduziertes Glutathion, 0,05 O.D._{260nm} Einheiten tRNA (für die Bestimmung der Protein-Methylierung wurde die tRNA weggelassen), 1,44 nM (¹⁴C-Methyl-)Ado-Met (spez. Akt. 13,9 Ci/Mol, für die homologe Methylierung wurde ein Ado-Met mit der spez. Akt. von 60,4 Ci/Mol verwendet), 30 - 40 µl (entspr. 0,6 - 0,9 mg Protein) einer Methylasepräparation (I, II oder III). Die Reaktionsmischung wurde bei 35°C inkubiert, in Abständen von 25 Minuten wurden jeweils 25 µl entnommen und auf Filterscheiben

gegeben. Diese wurden mit 5% TCA, Äther/Äthanol und Äther behandelt, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die säureunlösliche Aktivität bestimmt.

Für die Stimulierungsversuche mit Cadaverin, Putrescin, Spermin und Spermidin wurden diese Polyamine an Stelle von Magnesiumchlorid eingesetzt. Die optimale Konzentration der Polyamine wurde mit $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ als Substrat und Methylase II als Enzym ermittelt.

Für die Hemmungsversuche wurden $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}$ und $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ als Substrat und Methylase I verwendet. Zur Bestimmung der Hemmungsaktivität wurden folgende Verbindungen zum Standardansatz gegeben: 1 μM Nikotinamid, 0,5 μM , 1,0 μM , 3,0 μM , 5,0 μM INH, 0,1 μM Ethidiumbromid, 1,0 μM Guanosinphosphat, 1,0 μM Uridinphosphat, 0,5 μM Adenosin. Die Hemmung der Protein-Methylierung ergibt sich durch Weglassen der tRNA.

2.2 S-Adenosylmethionin spaltendes Enzym (52)

Die Aufarbeitung der Rattenleber und Fraktionierung an Hydroxylapatit wurde wie bei der Methylasepräparation durchgeführt (2.1a,b).

a. Test auf Ado-Met spaltende Aktivität (Abb.13, S.23)

150 μl Inkubationsvolumen enthielten: 50 μl einer Hydroxylapatitsäulenfraktion, 1 μM Magnesiumchlorid, 10 μM Tris pH 7,8, 1 μM reduziertes Glutathion, 0,05 O.D._{260nm} Einheiten unfraktionierte $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}$,

1,44 nM (^{14}C -Methyl-)Ado-Met (spez. Akt. 13,9 Ci/Mol), 750 μg Methylasepräparation III, 1 μM Nikotinamid oder 5 μM INH. Nach einer Stunde Inkubation bei 35°C wurden 100 μl - Anteile jedes Ansatzes auf Filterscheiben gegeben und diese behandelt wie unter 2.1c beschrieben. Fraktionen mit der höchsten Hemmungsaktivität wurden gesammelt, Ammonsulfatfällung und Dialyse analog der Methylasepräparation (2.1d,e,f) durchgeführt.

b. Kinetische Untersuchungen an Ado-Met-spaltendem Enzym
(Abb.11, S.20, Abb.12, S.21)

120 μl Inkubationsvolumen enthielten: 1 μM Magnesiumchlorid, 10 μM Tris pH 7,8, 1,44 nM (^{14}C -Methyl-)Ado-Met (spez. Akt. 13,9 Ci/Mol) oder 1,5 nM (^{14}C -Carboxyl-)Ado-Met (spez. Akt. 45 Ci/Mol), 40 μl Methylase I (entspr. 0,85 mg Protein) oder 30 μl Ado-Met spaltende Enzympräparation, 1 μM Nikotinamid oder 5 μM INH. Nach Inkubation bei 35°C wurden Anteile von 10 μl nach 0, 5, 15 und 30 Minuten (oder nach 30 und 60 Minuten) entnommen und auf Zellulose-Fertigplatten aufgetragen. Die Platten wurden entwickelt in den Laufmitteln A,B,C (siehe 5.1a). Die Laufhöhe betrug 11,5 cm. Zur Auswertung der Chromatogramme wurde die Schicht in 0,5 cm - Fraktionen abgeschabt, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und gezählt, wie in 5.2b beschrieben. Diese Kinetik wurde auch verwendet für die Bestimmung der Hemmungsaktivität von Isonikotinsäure (5 μM), Nikotinsäure, NAD, NADH (jeweils 1 μM).

2.3 Ribonuklease A aus Rinderpankreas

(Ribonucleatepyrimidine-nucleotide-2'-transferase,
cyclizing, E.C. 2.7.7.16)

Pankreatische RNase ist eine Endonuklease und spaltet RNA spezifisch bei Pyrimidinnukleotiden. Als Zwischenprodukte entstehen 2',3'-cyclische Phosphate, die zu Pyrimidin-3'-phosphaten, bzw. zu Oligonukleotiden mit den Endgruppen Pyrimidin-3'-phosphat hydrolysieren.

Inkubationsansatz: 8 O.D._{260nm} Einheiten tRNA^{f.Met}_{E.coli} in 500 µl 0,02 m Tris pH 7,5, 25 µl RNase A (= 10 E). Die Mischung wurde 5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit 315 mg Harnstoff auf eine Molarität von 7 gebracht.

2.4 Ribonuklease T₁ aus Aspergillus oryzae

(Ribonucleateguanine-nucleotide-2'-transferase
cyclizing, E.C. 2.7.7.26)

Als Endonuklease spaltet RNase T₁ die tRNA bei Guanosinphosphat. Über die Zwischenprodukte cyclische Guanosin-2',3'-phosphate entstehen Bruchstücke mit endständigem Guanosin-3'-phosphat.

Inkubationsansatz: 8 O.D._{260nm} Einheiten tRNA^{f.Met}_{E.coli} in 500 µl 0,02 m Tris pH 7,5, 5 µl RNase T₁ (= 25 E). Der Ansatz wurde 5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit 315 mg Harnstoff 7 molar gemacht.

2.5 Ribonuklease T_2 aus *Aspergillus oryzae* (E.C. 2.7.7.17)

Die Endonuklease T_2 spaltet RNA zu Mononukleosid-3'-phosphaten.

a. Spaltung unfractionierter tRNA oder in vitro methylierter tRNA^{Valin}_{K.L.} (Nukleotidanalyse)

Inkubationsansatz: 40 O.D._{260nm} Einheiten tRNA in 400 μ l 0,001 m Kaliumacetatpuffer pH 4,7, 2 μ l RNase T_2 (= 1 E). Der Ansatz wurde 18 Stunden bei 37°C inkubiert und dann im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 80 μ l Wasser gelöst. Von der Lösung wurden jeweils 20 μ l (entspricht 10 O.D._{260nm} Einheiten) auf Zellulose-Fertigplatten aufgetragen und nach 5.1d zweidimensional entwickelt (Abb.14, S.32, Abb.35, S.67).

b. Hydrolyse von Oligonukleotiden aus der RNase T_1 - oder RNase A - Spaltung (Nukleosidanalyse)

Inkubationsansatz: Oligonukleotid (bis zu 5 O.D._{260nm} Einheiten) in 50 μ l 0,001 m Kaliumacetatpuffer pH 4,7, 10 μ l RNase T_2 (= 0,05 E). Nach achtzehnstündiger Inkubation bei 37°C und nach Phosphatasebehandlung (nach 2.8) wurden die nun entstandenen Nukleoside auf Zellulose-Fertigplatten aufgetragen und eindimensional entwickelt (Laufmittel D, Detektion nach 5.2b)

2.6 Phosphodiesterase aus Schlangengift (von *Crotalus terr.*) (Orthophosphoric-diester-phospho-hydrolase, E.C. 3.1.4.1)

Das Enzym ist eine Exonuklease, spaltet vom 3'-Ende her und liefert Nukleosid-5'-phosphate.

Inkubationsmischung: 20 μ l m^6 (A-A-A) - Lösung, 100 μ l
(= 2 O.D._{260nm}) A-A-A-A - Lösung (1 mg / 1 ml),
0,02 m TEAB pH 8,5, 5 μ l Schlangengift-Phosphodiesterase
(= 25 μ g Protein), 0,001 m Kaliumphosphat pH 8.

Der Ansatz wurde 90 Minuten bei 37°C inkubiert und auf einer
Zellulose-Dünnschichtplatte mit den Testsubstanzen
pA, A und m^6 A eindimensional entwickelt (Laufmittel D,
Detektion nach 5.2b). (Abb.28,S.51)

2.7 Phosphodiesterase aus Kälbermilz

(Orthophosphoric-diester-phospho-hydrolase, E.C.3.1.4.1)

Das Enzym ist eine Exonuklease, spaltet vom 5'-Ende her
und liefert 3'-Nukleotide.

Inkubationsansatz: 20 μ l m^6 (A-A-A) - Lösung, 100 μ l
(= 2 O.D._{260nm}) A-A-A-A - Lösung (1 mg / 1 ml),
0,01 m Ammoniumacetat pH 5,7, 0,2 mmol EDTA, 0,005%
Tween 80, 5 μ l Milz-Phosphodiesterase (= 5 μ g Protein),
0,001 m Kaliumphosphat pH 8. Die Mischung wurde 90 Minu-
ten bei 37°C inkubiert und auf einer Zellulose-Fertig-
platte mit den Testsubstanzen Ap, A und m^6 A eindimen-
sional entwickelt (Laufmittel D, Detektion nach 5.2b).
(Abb.28,S.51).

2.8 Alkalische Phosphomonoesterase aus Kälberdarm

(Orthophosphoric-monoester-phospho-hydrolase,E.C.3.1.3.1)

Mit dem Enzym (es benötigt Zink- und Magnesiumionen)
können endständige Phosphatgruppen abgespalten werden.
Die Spaltungsbedingungen wurden bei verschiedenen
Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten mit Adenosin-

monophosphat als Substrat erarbeitet.

Inkubationsansatz: 5 O.D._{260nm} Einheiten Ap in 500 µl Wasser, 0,01 m TEAB pH 10,0, 0,001 m Magnesiumchlorid, 0,0001 m Zinksulfat, 10 µl Phosphatase (= 10 µg Protein-gehalt). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C war nach DC auf Zellulose-Fertigplatten in Laufmittel D nur noch das Nukleosid Adenosin sichtbar.

Diese Vorschrift wurde für Oligonukleotide und Mononukleotide in entsprechenden Konzentrationen verwendet.

3. Transfer - Ribonukleinsäuren

3.1 tRNA aus Rattenleber (121)

a. Phenolextraktion

Zu je 100 g tiefgefrorener Rattenleber wurden 150 ml Trispuffer pH 7,5 mit 0,1% Bentonit, 150 ml wässrige Phenollösung (4 + 1) mit 0,1% 8-Hydroxychinolin und 45 ml Saccharoselösung 1 m gegeben und die Mischung 2 Minuten im Braun Mixer homogenisiert. Nach 1 Stunde Schütteln wurde bei 5.000 x g von der Phenolphase abzentrifugiert. Durch das Phenolisieren werden Eiweißstoffe denaturiert und bleiben in der Phenolphase, während die wässrige Phase die löslichen Nukleinsäuren enthält.

b. 1.Äthanol-fällung

Der nach der Phenolextraktion erhaltene wässrige Überstand wurde mit 0,1 Volumen 2 m Natriumacetatpuffer pH 5,0

und mit dem zweifachen Volumen Äthanol versetzt. Nach sechzehnständigem Stehenlassen bei 0°C wurde vom Niederschlag abzentrifugiert, einmal mit Äthanol, 1/20 Volumen 20% Natriumacetatpuffer pH 5,0 enthaltend, einmal mit Äther/Äthanol 1 + 1, einmal mit Äther gewaschen und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

c. Adsorption an DEAE-Zellulose

Der bei der Äthanolfällung erhaltene Niederschlag wurde in 60 ml 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 (für je 100 g Rattenleber) gelöst und mit 20 g DEAE-Zellulose, äquilibriert mit 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,0, verrührt. Die Zellulose wurde im sogenannten Batchverfahren mit 0,1 m Natriumacetatpuffer pH 5,0 gewaschen, bis eine Zugabe von 2 Volumenteilen Äthanol das Filtrat nicht mehr trübte. Weiterer Waschvorgang: einmal mit 0,1 m Natriumacetat pH 5,0 - 0,1 m NaCl, einmal mit 0,1 m Natriumacetat pH 5,0 - 0,2 m NaCl, dreimal mit 0,1 m Natriumacetat pH 5,0 - 0,3 m NaCl.

Zur Desorption wurde die Zellulose mit kleinen Mengen 0,1 m Natriumacetat pH 5,0 - 1,0 m NaCl solange digeriert, bis das Filtrat bei 260 nm eine optische Dichte von weniger als 0,5 Einheiten/ml hatte.

d. 2.Äthanolfällung

Die vereinigten Filtrate wurden mit dem zweifachen Volumen Äthanol versetzt und nach sechzehnständigem Stehen bei 0°C vom Niederschlag abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde wie bei der 1.Äthanolfällung gewaschen und getrocknet (3.1b).

e. Isopropanolfällung

Die getrocknete Substanz wurde in der dem Gewicht entsprechender Menge (60 ml/g) 0,3 m Natriumacetatpuffer pH 7,0 durch zweistündiges Rühren gelöst und tropfenweise mit dem 0,54fachen Volumen Isopropanol versetzt. Nach dem Zentrifugieren, 10 Minuten bei 5.000 x g (das Pellet, das mRNA enthält, wurde verworfen), wurde die tRNA durch Zugabe von 0,44 Volumina Isopropanol ausgefällt. Der Niederschlag wurde wie bei der 1. Äthanol-fällung beschrieben, gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute betrug bei den einzelnen Präparationen zwischen 40 mg und 70 mg pro 100 g Rattenleber.

3.2 Fraktionierte transfer-Ribonukleinsäuren

tRNA^{f.Met}_{E.coli}, die bei den Versuchen verwendet wurde, war teilweise ein Geschenk von Dr. S. Nishimura, Tokyo. Der größere Teil, sowie tRNA^{Valin}_{E.coli} und tRNA^{Valin}_{K.L.} wurde in der Arbeitsgruppe durch Fraktionieren von tRNA_{E.coli} oder tRNA aus Kaninchenleber an DEAE-Sephadex A-50 Säulen (122) und anschließender Chromatographie mit benzoylierter DEAE-Zellulosesäulen (123) hergestellt.

3.3 In vitro methylierte tRNA

a. Methylierungsansatz

Für die präparative Herstellung von ¹⁴C-methylierter tRNA wurden folgende Ansätze zwei Stunden bei 35°C inkubiert: 10 µM Magnesiumchlorid oder 1 µM MgCl₂ und

30 μM Cadaverin, 10 μM reduziertes Glutathion, 100 μM Tris pH 7,8, 28,8 nM (^{14}C -Methyl-)Ado-Met (spez. Akt. 13,9 Ci/Mol), 0,5 O.D._{260nm} Einheiten $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ und 400 μl Methylase I oder II.

Die homologe Methylierung von $\text{tRNA}_{\text{K.L.}}^{\text{Valin}}$ wurde mit dem doppelten Ansatz durchgeführt, statt Cadaverin wurden 0,1 μM Spermin verwendet. Ado-Met hatte dabei eine spezifische Aktivität von 64 Ci/Mol.

b. Adsorption an DEAE-Zellulose

Der Methylierungsansatz wurde nach Inkubation auf eine kleine Säule von 0,5 cm $\varnothing$, 4,5 cm hoch gefüllt mit DEAE-zellulose (äquilibriert mit 0,02 m Natriumacetatpuffer pH 5) gegeben. Nach dem Auftragen wurde dreimal mit 1 ml 0,02 m Natriumacetatpuffer pH 5, fünfmal mit je 0,02 m Natriumacetatpuffer pH 5, - 0,2 m NaCl gewaschen. Anschließend wurde die tRNA mit dreimal je 1 ml 0,02 m Natriumacetatpuffer pH 5, - 1 m NaCl eluiert.

c. Phenolbehandlung

Das Eluat wurde zweimal mit je 1 ml wässriger Phenollösung (Phenol : Wasser = 4:1) versetzt, nach 10 Minuten Durchmischen zentrifugiert und die Oberphase abgezogen.

d. Äthanol-fällung

Zu dieser wässrigen Lösung wurden 15 O.D._{260nm} Einheiten $\text{tRNA}_{\text{E.coli}}^{\text{f.Met}}$ als "Carrier" und das zweifache Volumen Äthanol gegeben. Nach sechzehnständigem Aufbewahren bei -20°C

wurde abzentrifugiert und der Niederschlag, der die tRNA enthielt, an der Luft getrocknet. Die tRNA^{f.Met}_{E.coli} wurde nach 4.), die im homologen System methylierte tRNA^{Valin}_{K.L.} nach 2.5a weiterbehandelt.

e. Elektrophorese

Etwa 0,2 O.D._{260nm} Einheiten tRNA^{f.Met}_{E.coli} wurden 2 Stunden lang mit Methylase II und Cadaverin unter Methylierungsbedingungen inkubiert und wie oben isoliert. In einem Disk-Elektrophorese-System nach (124) wurde auf Unversehrtheit der tRNA^{f.Met}_{E.coli} geprüft.

4. Analyse der in vitro methylierten tRNA

4.1 DEAE-Sephadex A-25 - Chromatographie nach RNase A- und RNase T₁-Spaltung (125) (Abb.21,S.42, Abb.22,S.43)

Die nach 3.3 erhaltene tRNA wurde in jeweils 1 ml Wasser gelöst. 500 µl wurden mit RNase A (2.3), 500 µl mit RNase T₁ (2.4) gespalten. Das dadurch erhaltene Oligonukleotidgemisch wurde an 120 cm langen Säulen von 0,4 cm Ø, gefüllt mit Sephadex A-25 (einem schwachen Anionenaustauscher) getrennt: Das Säulenmaterial wurde mit einem Puffer aus 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris pH 7,5, 0,14 m NaCl in Wasser äquilibriert und eingefüllt. Nach dem Auftragen des Oligonukleotidgemisches in 7 m Harnstoff wurde mit 5 ml Puffer nachgewaschen und mit einem linearen Gradienten von 225 ml 0,14 m NaCl in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris pH 7,5 in der Mischkammer und 225 ml 0,43 m NaCl in 7 m Harnstoff, 0,02 m Tris

pH 7,5 im Vorratsgefäß eluiert. Die optische Dichte der Fraktionen wurde durch Messen der Extinktion bei 260 nm erhalten. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden 200 µl jeder Fraktion mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Toluol, Cellosolve, PPO - 1000 / 500 / 6 = ml/ml/g) versetzt und im Szintillationsspektrometer gemessen.

4.2 Entsalzen der Fraktionen

Von den durch Säulenchromatographie in 7 molar Harnstoff erhaltenen Peaks mit optischer Dichte oder Radioaktivität wurden die Fraktionen gesammelt und nach einem der folgenden Verfahren von Harnstoff, NaCl und Tris befreit:

a. Gelchromatographie an Biogel P 2 (126)

Eine 45 cm lange Säule von 2 cm Ø wurde mit einer wässrigen Aufschlammung von Biogel P 2 gefüllt. Die salzhaltige Nukleotidlösung wurde mit etwas Uracil als Marker vorsichtig, ohne weitere Verdünnung aufgetragen und mit Wasser eluiert. Da Biogel eine Ausschlußgrenze von 1.800 Dalton hat, werden Oligonukleotide mit der Front eluiert. Harnstoff zusammen mit dem durch die Absorption bei 260 nm nachweisbaren Uracil erst nach längerer Retentionszeit. Die Fraktionen mit Nukleotidgehalt, nachgewiesen entweder durch Messung der Extinktion bei 260 nm oder durch Bestimmung der Radioaktivität, wurden gesammelt und mit dem Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingengt.

b. Chromatographie an DEAE-Zellulose (127)

Zum Entsalzen der kürzeren Oligonukleotide (Abb.21,S.42, Peak I,II,3,4, Abb.22,S.43, Peak I,III,3), besonders der Mononukleotide (Abb.21,S.42, Peak I), die bei der Verwendung von Biogelsäulen durch ihr kleines Molekulargewicht zulange zurückgehalten werden, wurde eine Anionenaustauschchromatographie an kleinen Säulen verwendet. DEAE-Zellulose wurde mit 0,01 m TEAB-Puffer pH 8,5 äquilibriert und in einer Aufschwemmung mit diesem Puffer in Säulen von 0,5 cm Ø, 3 cm hoch eingefüllt. Die 7 m Harnstoff, Tris und NaCl enthaltende Probe wurde mit dem zehnfachen Volumen 0,01 m TEAB-Puffer pH 8,5 verdünnt und auf die Säule aufgetragen. Nach dem Waschen mit 10 Säulenvolumen 0,01 m TEAB wurde 5 mal mit je 1 ml 2 m TEAB-Puffer pH 8,5 eluiert. Die Bestimmung der Radioaktivität oder der optischen Dichte zeigte, daß die Nukleotide mit den ersten drei Fraktionen praktisch vollständig eluiert waren. Die gesammelten Fraktionen wurden im Vakuum vom TEAB-Puffer befreit. Um die Reste der Puffersubstanz zu entfernen, wurde der Rückstand mit etwas Methanol aufgenommen und wieder eingengt.

4.3 Identifizierung der methylierten Nukleoside

a. Peak I des T_1 - und RNase A-Spaltmusters wurden nach 2.5a mit RNase T_2 gespalten und nach 2.8 mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die dabei entstehenden Nukleoside wurden mit den Testsubstanzen m^2G und m^2G im Laufmittel D chromatographiert und nach 5.2b die Radioaktivität bestimmt. (Abb.23,S.44)

b. Peak II des T_1 - und RNase A-Spaltmusters wurden jeweils in 0,5 ml 0,1 m Tris pH 9,5 gelöst und 90 Minuten bei 100°C erhitzt (Umlagerung m^1A in m^6A). Nach Zugabe von je 350 mg Harnstoff wurde das RNase A-Fragment zusammen mit dem Fragment 3 (Abb.21, S.42) und das T_1 -Fragment mit den Fragmenten 6,7,8 (Abb.22, S.43) an Sephadex A-25 wie unter 4.1 beschrieben chromatographiert. Die radioaktiven Peaks wurden wieder gesammelt, die entsalzten Fragmente mit T_2 und Phosphatase zu Nukleosiden abgebaut und mit der Testsubstanz m^6A auf Zellulose-Fertigplatten cochromatographiert (Laufmittel D). (Abb.23, S.44)

Zur Bestimmung der Position des m^6A in der Sequenz -A-A-A-Up wurde der doppelte Methylierungsansatz nach 3.3a hergestellt und die methylierte tRNA in 0,1 m Tris pH 9,5 bei 100°C (Umlagerung von m^1A in m^6A) behandelt. Nach Spaltung mit RNase A wurde wieder an Sephadex A-25 in Harnstoff chromatographiert. Das Fragment 4 (A-A-A-Up) und das Fragment (^{14}C -) $m^6(\text{A-A-A})p$ wurden zusammen von der Säule eluiert (Abb.21, S.42, Fr. 70 - 77) und die Fraktionen anschließend entsalzt. Mit alkalischer Phosphatase wurde der Phosphatrest am 3'-Ende abgespalten und die Lösung mit 5 O.D._{260nm} Einheiten A-A-A-A versetzt.

Chemischer Abbau des 3'-endständigen Nukleosids:

Die Lösung wurde mit 1 m Kaliumphosphatpuffer auf pH 8,0 gebracht und mit 0,4 mg Natriumperjodat 20 Minuten bei 20°C inkubiert. Zu diesem Gemisch wurde 2 μl über Aluminiumoxid filtriertes Cyclohexylamin gegeben und 90 Minuten bei 45°C erhitzt. Die salzhaltige Lösung wurde mit einem DEAE-Zellulosesäulchen entsalzt und erneut mit Phosphatase behandelt. Die Phosphatase wurde

durch Dünnschichtchromatographie in Laufmittel E abgetrennt (Abb.27,S.49), die Radioaktivität mit dem DC-Scanner lokalisiert, der Marker A-A-A mit UV-Licht. Nach dem Eluieren mit 0,01 m TEAB-Puffer pH 8,5 wurde einrotiert und der Rückstand in 500 μ l Wasser gelöst. Je 20 μ l wurden mit Schlangengift-Phosphodiesterase, Milz-Phosphodiesterase und RNase T₂ + Phosphatase behandelt und im Laufmittel D auf Zellulose-DC-Fertigplatten chromatographiert. Die Radioaktivität wurde durch Abschaben der Schicht (5.2b) bestimmt. (Abb.28,S.51)

- c. Peak III der RNase T₁-Spaltung wurde in 0,5 ml 0,1 m Tris pH 9,5 90 Minuten bei 100°C erhitzt. Zusammen mit dem Peak 3 (Abb.22,S.43) wurde in 7 m Harnstoff an Sephadex A-25 chromatographiert. Die Fraktionen mit Radioaktivität wurden wieder gesammelt und entsalzt. Zur Identifizierung des Nukleosids wurden Peak III der T₁- und RNase A-Spaltung mit RNase T₂ und Phosphatase gespalten und im Laufmittel D mit authentischem m⁵C cochromatographiert. (Abb.23,S.44)

5. Dünnschicht- und Papierchromatographie

5.1 Laufmittel

- a. Zur Auftrennung der Ado-Met-Zersetzungsprodukte:

A = n-Butanol, Eisessig, Wasser 60:15:25

B = Äthanol, Wasser 64:36

C = 600 g Ammoniumsulfat, 20 ml 2-Propanol in 1 l
0,1 m Natriumphosphatpuffer pH 6,8

b. für Nukleoside:

D = 2-Propanol, 15 m Ammoniak, Wasser 7:1:2

c. für Nukleotide:

E = 1-Propanol, 15 m Ammoniak, Wasser 55:10:35

d. für zweidimensionale Dünnschicht- oder Papierchromatographie von Nukleotidgemischen (128)

F = Isobuttersäure, Ammoniak, Wasser 577:38:385 pH 4,3
(1. Dimension)

G = t-Butanol, konz. HCl, Wasser 7:1,5:1,5
(2. Dimension)

Papierchromatographie wurde an Whatman Nr. 1 - Papier entweder im aufsteigenden oder im absteigenden System durchgeführt.

e. für die Identifizierung des m_2^6A :

H = n-Butanol, Eisessig, Wasser 45:5:12,5

I = n-Butanol, Wasser 85:15

K = Methanol, Wasser 75:25

5.2 Detektion

a. Ultraviolettes Licht bei 254 nm (Nukleotide, Nukleoside, Oligonukleotide)

b. Radioaktiv markierte Verbindungen wurden durch Abschaben der Zelluloseschicht mit einem halbautomatischen Dünnschicht-Scraper in 0,5 cm - Fraktionen bestimmt (129) (Abb.11, S.20, Abb.23, S.44, Abb.28, S.51)
Die Fraktionen wurden mit 10 ml Toluol/PPO/Cellosolve (1000/500/6 - ml/ml/g) versetzt und im Szintillationsspektrometer gemessen.

c. Die präparative DC des radioaktiv markierten Trinukleotids $m_6^6(A-A-A)$ wurde mit dem DC-Scanner ausgewertet (Abb.27, S.49).

- d. Autoradiographie: Zur Detektion der Nukleotidzusammensetzung der in vitro mit Kaninchenleberenzym methylierten tRNA^{Valin}_{K.L.} wurden die zweidimensional entwickelten DC-Platten mit Kodak RP Royal X-Omat-Film eine Woche exponiert. (Abb.35,S.67)

Die DC-Platte der in vivo äthylierten Nukleotide wurde 2 Monate mit demselben Filmmaterial exponiert. (Abb.17,S.67)

- e. 0.1% alkoholische Ninhydrinlösung wurde als Sprühmittel zur Detektion der Aminogruppe des Methionins bzw. des Ado-Met verwendet. Nach dem Besprühen wurden die Platten durch Erhitzen angefärbt.

6. Ultra-Violett-Spektren

Die Proben wurden mit dem Spektrophotometer im Absorptionbereich 0,2 bei pH 7,0, pH 1,0, pH 13,0 gemessen.

(Abb.15,S.33)

7. Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer CH 7 der Firma Varian Mat aufgenommen. Einlaß: 185°C. Elektronenenergie: 70 eV, Emission: 300 µAmp. (Abb.16,S.34)

8. Tierversuche

Tiere: weibliche Albinoratten vom Stamm Wistar waren zu Beginn der Versuchsreihe etwa 190 g schwer.

- a. L-Äthionin bzw. D-Äthionin wurde zu 0,3%, Nikotinamid zu 0,5% unter Altromin-Trockenfutter in Pulverform gemischt. Das Material wurde mit heißem Wasser ange-

teigt, in kleine Brocken geformt und an der Luft getrocknet. Die Kontrolltiere erhielten das Standard-Altrominfutter (in allen Fällen Wasser ad libitum). Nach Ablauf der im Versuchsplan vorgesehenen Zeiten wurden die Tiere durch Genickschlag getötet, die Lebern entnommen und diese sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Eine Rattenleber aus 7 Monaten l-Äthioninfütterung wurde im Pathologischen Institut der Universität München auf makroskopische oder mikroskopische Veränderungen untersucht. Der makroskopische Befund für carcinogene Veränderungen war negativ (carcinogene Veränderungen sind nach (27) erst nach ca 6 - 8 Monaten zu sehen), mikroskopisch war eine für L-Äthionin typische Gallengangsproliferation zu erkennen.

Art des Futters	Versuchsdauer			
	4 Wochen	4 Wochen+10 Tage Normalfutter	3 Mon.	3 Mon.+10 Tage Normalfutter
L-Äthionin 0,3 %	(12)	(12)	(12)	(12)
D-Äthionin 0,3 %	(12)	--	--	--
Normalfutter	(12)	--	(12)	--
Nikotinamid 0,5 %	--	--	(12)	--

Tabelle 4

Tierversuchsplan, (12) = Zahl der Tiere pro Versuch

Bei jedem Versuch wurde die tRNA isoliert und mit Ausnahme der Nikotinamid-gefütterten Ratten die Methylaseaktivität (nach 2.1f) und -spezifität (Test der Hydroxylapatit-Säulenchromatographiefraktionen, 2.1c) bestimmt.

- b. Einer 7 Monate mit 0,3% L-Äthionin gefütterten Ratte wurden 25 μCi (^{14}C -Äthyl-)L-Äthionin (spez. Akt. 4,13 Ci/Mol) i.p. injiziert. Nach 24 Stunden wurde die Ratte getötet, die Leber entnommen und nach 3.1 die tRNA isoliert. Nukleotidanalyse nach RNase T_2 -Spaltung (2.5a) wurde durch zweidimensionale DC nach 5.1d und Autoradiographie nach 5.2d durchgeführt.
(Abb.17, S.36)

D. Zusammenfassung

1. tRNA-Methyltransferasen wurden aus Rattenleber in Anlehnung an (21) partiell gereinigt und durch ihre Methylierungsaktivität gegen verschiedene tRNA-spezies charakterisiert.

Für in vitro - Methylierungsversuche wurden geeignete Bedingungen erarbeitet.

2. Nikotinsäureamid (von Halpern et al. (21) irrtümlich als natürlicher Inhibitor der tRNA - Methylasen beschrieben) und die strukturanalogen Verbindungen Isonikotinsäurehydrazid, NAD und NADH hemmten die tRNA- und Protein - Methylierung. Keine Hemmungsaktivität hatten Isonikotinsäure und Nikotinsäure.

Ethidiumbromid hemmt nur die tRNA - Methylierung, nicht jedoch die Protein - Methylierung.

Durch Mononukleoside (Adenosin) oder Mononukleotide (Guanosinphosphat, Uridinphosphat) sind die Methylasen kompetitiv nicht hemmbar.

3. Zur Aufklärung des Mechanismus der Methylasehemmung durch Nikotinamid oder Isonikotinsäurehydrazid wurden zwei Methoden entwickelt:

- Dünnschichtchromatographie des Methylierungsansatzes mit Nikotinamid oder INH zeigte in Abhängigkeit von Zeit und Proteinmenge das Auftreten von S-Adenosylmethionin - Abbauprodukten, die jedoch nicht identifiziert werden konnten.
- Durch einen Enzymtest konnte in Rattenleber ein S-Adenosylmethionin spaltendes oder veränderndes, Nikotinamid abhängiges Enzym nachgewiesen werden, welches zusammen mit den Methylase I und II - Präparationen isoliert wird.

Der Mechanismus der Methylierungshemmung beruht auf der Aktivierung eines S-Adenosylmethionin spaltenden Enzyms durch Nikotinamid oder INH (irreversible Substrathemmung).

4. Das Lebercarcinogen L-Äthionin wurde zu 0,3% als Futterbeimischung an Ratten verfüttert. Kontrolltiere bekamen 0,3% D-Äthionin bzw. Normalfutter. Es wurde in den Lebern untersucht: Methylaseaktivität und Nukleotidzusammensetzung der tRNA.
 - a. Nach 3 Monaten L-Äthionin-Fütterung war die Methylaseaktivität erhöht, ging aber nach 2 Wochen Normalfütterung wieder auf den Normalwert zurück.
Bei der Methylasestimulierung handelt es sich daher möglicherweise um einen cytotoxischen Effekt des L-Äthionins.

- b. Eine Änderung der Methylasespezifität konnte nicht festgestellt werden.
- c. Die Nukleotidzusammensetzung der tRNA wurde mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie untersucht. Ein früher Effekt der L-Äthionin-Fütterung war die Hemmung der Biosynthese eines modifizierten Nukleotids. Das Fehlen diese Nukleotids wurde auch durch anschließende zehntägige Fütterung mit Normalfutter nicht aufgehoben. In der tRNA von Ratten, die mit D-Äthionin gefüttert worden waren, konnte das identifizierte Nukleotid bei jedem Versuch nachgewiesen werden.

Das Nukleotid wurde nach Dephosphorylierung durch das Ultra-Violett-Spektrum, durch vergleichende Dünnschichtchromatographie mit authentischem Material und durch das Massenspektrum als N⁶-Dimethyl-Adenosin identifiziert.

5. Biogene Diamine und Polyamine stimulieren die tRNA - Methylierung. tRNA^{f.Met}_{E.coli} wurde in Gegenwart von Mg⁺⁺ und Cadaverin mit Rattenleberenzym methyliert. Die Identifizierung der methylierten Nukleoside brachte folgende Ergebnisse:

	1 mmolar oder 10 mmol Mg ⁺⁺	1 mmolar Mg ⁺⁺ und 30 mmolar Cadaverin	30 mmolar Cadaverin
N ² -Methyl-Guanosin Position 27	+	+	+
1-Methyl-Adenosin Position 59	-	+	+
5-Methyl-Cytidin Position 49	-	-	+

Durch Bestimmung der differenzierten Schmelzkurven (mit Dr. D. Riesner) kann diese stufenweise Methylierung auf eine zweiphasische Auffaltung der Tertiärstruktur zurückgeführt werden.

Die Stimulierung der tRNA - Methylierung durch Polyamine besteht in einer Änderung der tRNA - Tertiärstruktur.

6. Eine Hypothese für eine Funktion der biogenen Amine in vivo wurde aufgestellt:
Sie ermöglichen durch Auflockerung der tRNA - Tertiärstruktur die Wechselwirkung zwischen Ribosomen und tRNA bei der Proteinbiosynthese.
7. Homologe Methylierung von tRNA^{Valin} aus Kaninchenleber konnte in geringem Ausmaß mit Kaninchenleberenzym und Mg^{++} oder Spermin erreicht werden. Der Einbau von Methylgruppen in Guanosin, Adenosin und Cytidin wurde nachgewiesen.

E. Literaturverzeichnis

- 1 R.W. Holley, J. Apgar, G.A. Everett, J.T. Madison
M. Marquise, S.H. Merrill, J.R. Penswick, A. Zamir
Science 147, 1462, (1965)
- 2 M. Staehelin, H. Rogg, B.C. Baguley, T. Ginsberg,
W. Wehrli
Nature 219, 1363, (1968)
- 3 G. Keith, F. Picaud, J. Weissenbach, J.P. Ebel,
G. Petrissant, G. Dirheimer
FEBS Letters 31, 345, (1973)
- 4 G. Keith, A. Roy, J.P. Ebel, G. Dirheimer
FEBS Letters 17, 306, (1971)
- 5 Y. Yamada, H. Ishikura
FEBS Letters 29, 231, (1973)
- 6 U.L. RajBhandary, S.H. Chang
J. Biol. Chem. 243, 598, (1968)
- 7 S.H. Kim, G.J. Quigley, F.L. Suddath, A. McPherson,
D. Snedon, J.J. Kim, J. Weinzierl, A. Rich
Science 179, 285, (1973)
- 8 M. Sprinzl, K.H. Scheit, H. Sternbach, F. von der Haar,
F. Cramer
Biochem. biophys. Res. Commun. 51, 881, (1973)
- 9 M. Sprinzl, F. Cramer
Nature New Biology, 245, 3, (1973)
- 10 M. Simsek, J. Ziegenmeyer, J. Heckman, U.L. RajBhandary
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1041, (1973)
- 11 G. Petrissant
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1046, (1973)
- 12 R.H. Hall in "The Modified Nucleosides in Nucleic Acids"
New York and London, Columbia Press (1971)
- 13 S. Altman
Nature New Biology 229, 19, (1971)

- 14 H. Hayashi, H. Fischer, D. Söll
Biochemistry 8, 3680, (1969)
- 15 E. Fleissner, E. Borek
Biochemistry 2, 1093, (1963)
- 16 J. Hurwitz, M. Gold, H. Anders
J. Biol. Chem. 239, 3462, (1964)
- 17 G. Björk, J. Svensson
Eur. J. Biochem. 9, 207, (1969)
- 18 B. Baguley, M. Staehelin
Biochemistry 7, 45, (1968)
- 19 B. Baguley, M. Staehelin
Eur. J. Biochem. 6, 1, (1968)
- 20 B. Baguley, W. Wehrli, M. Staehelin
Biochemistry 9, 1945, (1970)
- 21 Y. Kuchino, S. Nishimura
Biochem. biophys. Res. Commun. 40, 306, (1970)
- 22 R.M. Halpern, S.Q. Chaney, B.C. Halpern, R.A. Smith
Biochem. biophys. Res. Commun. 42, 602, (1971)'
- 23 L.S. Goodman, A. Gilman in "The Pharmacological Basis
of Therapeutics", 4th. ed. New York, N.Y. The Macmillan
Co, Seite 1324, (1970)
- 24 B.W. Stewart, A.E. Pegg
Biochem. biophys. Acta 281, 416, (1972)
- 25 E. Borek, S.J. Kerr
Adv. Cancer Res. 15, 163, (1972)
- 26 P.L. Bergquist, R.E.F. Matthews
Biochem. J. 85, 305, (1962)
- 27 E. Farber
Adv. Cancer Res. 7, 383, (1963)
- 28 P.S. Leboy
Biochemistry 9, 1577, (1970)
- 29 A.E. Pegg
Biochim.biophys. Acta 232, 630, (1971)

- 30 P. Kahle, P. Hoppe-Seyler, H. Kröger
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1163 (1969)
- 31 A.M. Kaye, P.S. Leboy
Biochim. biophys. Acta 157, 289, (1968)
- 32 S.J. Kerr
J. Biol. Chem. 247, 4248, (1972)
- 33 R. Rodeh, M. Feldman, U.Z. Littauer
Biochemistry 6, 451, (1967)
- 34 R.J. Mans, G.D. Novelli
Biochem. biophys. Res. Commun. 3, 540, (1960)
- 35 W.K. Paik, S. Kim
Science 174, 114, (1971)
- 36 R.M. Hoskinson, H.G. Khorana
J. Biol. Chem. 240, 2129, (1965)
- 37 L.N. Simon, A.J. Glasky, T.H. Rejal
Biochim. biophys. Acta 142, 99, (1967)
- 38 R.L. Hancock, P. McFarland, R.R. Fox
Experientia 23, 806, (1967)
- 39 S.J. Kerr
Biochemistry 9, 690, (1970)
- 40 S.J. Kerr
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 406, (1971)
- 41 J. Hurwitz, M. Gold, H. Anders
J. Biol. Chem. 239, 3474, (1964)
- 42 A.E. Pegg
FEBS Letters 16, 13, (1971)
- 43 S.Q. Chaney, B.C. Halpern, R.M. Halpern, R.A. Smith
Biochem. biophys. Res. Commun. 40, 1209, (1970)
- 44 H.J. Gross, D. Wildenauer
Biochem. biophys. Res. Commun. 47, 1215, (1972)
- 45 N.O. Kaplan, M.M. Ciotti, M. Hamalsky, R.E. Bieber
Science 131, 392, (1960)

- 46 M. Plempel
M.kurse ärztl. Fortbildung 19, 177, (1969)
- 47 J.K. Seydel, E. Wempe, H.J. Nestler
Arzneimittel - Forsch. 18, 362, (1968)
- 48 R.L. Hancock
Physiol. Chem. and Physics 4, 173, (1972)
- 49 M.J. Waring
J.mol. Biol. 13, 269, (1965)
- 50 L.G. Lermer
J. mol. Biol. 3, 18, (1961)
- 51 E. Wainfan, E. Borek
Mol. Pharmacol. 3, 595, (1967)
- 52 H.J. Gross, D. Wildenauer
Biochem. biophys. Res. Commun. 48, 58, (1972)
- 53 G.L. Cantoni
in "Methods in Enzymology" ed. by S.P. Colowick und
N.O. Kaplan, Academic Press Inc. New York,
Vol. II, Seite 257, (1955)
- 54 Y. Kuchino, H. Endo
J. Biochem. (Tokyo) 71, 719, (1972)
- 55 P. Hannonen, J. Jänne, A. Raina
Biochem. biophys. Res. Commun. 46, 341, (1972)
- 56 V. Zappia, C.R. Zydek-Cwick, F. Schlenk
J. Biol. Chem. 244, 4499, (1969)
- 57 P.R. Srinivasan, E. Borek
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 49, 529, (1963)
- 58 P.R. Srinivasan, E. Borek
Science 145, 548, (1964)
- 59 E. Tsutsui, P.R. Srinivasan, E. Borek
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 56. 1003, (1966)
- 60 R.L. Hancock
Cancer Res. 27, 646, (1967)
- 61 E.S. McFarlane, G.H. Shaw
Can. J. Microbiol. 14, 499, (1968)

- 62 A. Mittelman, R.H. Hall, D.S. Yohn, J.T. Grace
Cancer Res. 27, 1409, (1967)
- 63 B. Sheid, S.M. Wilson, H.P. Morris
Cancer Res. 31, 774, (1971)
- 64 E. Farber, P.N. Magee
Biochem. J. 76, 58P, (1960)
- 65 P.N. Magee, E. Farber
Biochem. J. 83, 114, (1962)
- 66 P.N. Magee, J.M. Barnes
Adv. Cancer Res. 10, 163, (1967)
- 67 V.M. Craddock
Biochim. biophys. Acta 272, 288, (1972)
- 68 M.J. Stewart, M.H. Corrance
Cancer Res. 29, 1642, (1969)
- 69 E. Borek
in P.N. Magee: "Modern Aspects of Chemical Carcingogenesis"
FEBS Letters 25, 210, (1972)
- 70 B.G. Moore, R.C. Smith
Can. J. Biochem. 47, 561, (1969)
- 71 R.L. Hancock
Biochem. biophys. Res. Commun. 31, 77, (1968)
- 72 Y. Kuchino, H. Endo, S. Nishimura
Cancer Res. 32, 1243, (1972)
- 73 F. Harada, H.J. Gross, F. Kimura, S.H. Chang,
S. Nishimura, U.L. RajBhandary
Biochem. biophys. Res. Commun. 33, 299, (1968)
- 74 H.J. Gross
Persönliche Mitteilung
- 75 D.B. Dunn
Biochem. biophys. Acta 34, 286, (1959)
- 76 C.J. Lai, B. Weisblum
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68, 856, (1971)
- 77 P. Fellner, F. Sanger
Nature 219, 236, (1968)

- 78 H.J. Gross
J. Molec. Evolution im Druck
- 79 H.J. Gross
unveröffentlicht
- 80 A.E. Pegg
Biochem. J. 128, 59, (1972)
- 81 L. Rosen
Biochem. biophys. Res. Commun. 33, 546, (1968)
- 82 E. Farber, K.H. Shull, S. Villa-Trevino,
B. Lombardini, M. Thomas
Nature 203, 34, (1964)
- 83 R.C. Smith, W.D. Salmer
Archs. Biochem. Biophys. 111, 191, (1965)
- 84 K.H. Shull, J. McConomy, M. Vogt, A. Costillo,
E. Farber
J. Biol. Chem, 241, 5060, (1966)
- 85 B.J. Ortwerth, G.D. Novelli
Cancer Res. 29, 380, (1969)
- 86 R.L. Hancock
Cancer Res. 26, 2425, (1966)
- 87 R. Axel, I.B. Weinstein, E. Farber
Proc. Nat. Atl. Soc. U.S.A. 58, 1255, (1967)
- 88 K.A. Abraham
Eur. J. Biochem. 5, 143, (1968)
- 89 Y. Takeda, K. Igarashi
Biochem. biophys. Res. Commun. 37, 917, (1969)
- 90 K. Igarashi, Y. Takeda
Biochim. biophys. Acta 213, 240, (1970)
- 91 D. Wildenauer, H.J. Gross, D. Riesner
Manuskript in Vorbereitung
- 92 S.K. Dube, K.A. Marcker, B.F.C. Clark, S. Cory
Eur. J. Biochem. 8, 244, (1969)
- 93 S.K. Dube, K.A. Marcker
Eur. J. Biochem. 8, 256, (1969)

- 94 S.K. Dube, K.A. Marcker, B.F.C. Clark, S. Cory
Nature 218, 232, (1968)
- 95 P. Brookes, P.D. Lawley
J. Chem. Soc. 539, (1960)
- 96 D.J. Brown
Nature 189, 828, (1961)
- 97 J.B. Macon, R. Wolfenden
Biochemistry 7, 3453, (1968)
- 98 P.R. Whitfeld
Biochem. J. 58, 390, (1954)
- 99 J.X. Khym, W.E. Cohn
J. Biol. Chem. 236, PC9, (1961)
- 100 M. Staehelin
Experientia 27, 1, (1971)
- 101 P.D. Lawley, P. Brookes
Biochem. J. 89, 127, (1963)
- 102 Y. Kuchino, T. Seno, S. Nishimura
Biochem. biophys. Res. Commun. 43, 476, (1971)
- 103 H.J. Gross, E.M. Czerny
FEBS Letters 30, 347, (1973)
- 104 M.N. Thang, W. Guschlbauer, H.G. Zachau, M. Grunberg-
Manago
J. mol. Biol. 26, 403, (1967)
- 105 P.S. Leboy
FEBS Letters 16, 117, (1971)
- 106 A.E. Pegg
Biochem. J. 129, 40P (1972)
- 107 D.V. Young, P.R. Srinivasan,
Biochim. biophys. Acta 238, 447, (1971)
- 108 P.E. Cole, S.K. Yang, D.M. Crothers
Biochemistry 11, 4358, (1972)
- 109 P.E. Cole, D.M. Crothers
Biochemistry 11, 4368, (1972)
- 110 D. Riesner
Persönliche Mitteilung

- 111 M. Levitt
Nature 224, 759, (1969)
- 112 T. Cashmore
Nature New Biology 230, 236, (1971)
- 113 A.R. Cashmore, D.M. Brown, J.D. Smith
J. mol. Biol. 59, 359, (1971)
- 114 W. Zillig, W. Krone, M. Albers
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 317, 131, (1959)
- 115 G. Turnock, B. Birch
Eur. J. Biochem. 33, 467, (1973)
- 116 H.G. Williams-Ashman, A.E. Pegg, D.H. Lockwood
Adv. Enzyme Regul. 7, 291, (1969)
- 117 A.E. Pegg, H.G. Williams-Ashman
J. Biol. Chem. 244, 682, (1969)
- 118 L.R. Mandel, E. Borek
Biochemistry 2, 555, (1963)
- 119 C.J. Wust, L. Rosen
Exp. Geront. 7, 331, (1972)
- 120 A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David
J. Biol. Chem. 177, (1949)
- 121 H. Rogg, W. Wehrli, M. Staehelin
Biochim. biophys. Acta 195, 13, (1969)
- 122 S. Nishimura, F. Harada, U. Narushima, T. Seno
Biochim. biophys. Acta 142, 133, (1967)
- 123 I. Gillam, S. Millward, D. Blew, M. von Tigerstrom,
E. Wimmer, G.M. Tener
Biochemistry 6, 3043, (1967)
- 124 P. Philippsen, R. Thiebe, W. Wintermeyer, H.G. Zachau
Biochem. biophys. Res. Commun. 33, 922, (1968)
- 125 G.M. Tener
in "Methods in Enzymology" ed. by S.P. Colowick and
N.O. Kaplan, Academic Press Inc. New York,
Vol. XII A, Seite 398, (1967)

- 126 M. Uziel, W.E. Cohn
Biochim. biophys. Acta 103, 539, (1965)
- 127 G.W. Rushizky, H.A. Sober
Biochim. biophys. Acta 55, 217, (1962)
- 128 M. Saneyoshi
unveröffentlicht
- 129 G. Kasang, G. Göldner, N. Weiss
J. Chromatography 59, 393, (1971)

F. Lebenslauf

Am 25. Juni 1940 wurde ich als Sohn des Lehrers Paul Wildenauer und seiner Ehefrau Hannelore, geborene Güldner, in Berlin geboren.

In München besuchte ich von 1946 bis 1950 die Volksschule, anschließend das Ludwigs Gymnasium bis zur Reifeprüfung 1959. Nach zweijährigem Apothekerpraktikum 1960 bis 1962 in Wartenberg/Obb. wurde im Wintersemester 1964 mit dem Studium der Pharmazie in München begonnen und im Mai 1968 das pharmazeutische Staatsexamen abgelegt.

Von 1968 bis 1969 war ich Kandidat der Pharmazie in München. von 1970 bis 1971 arbeitete ich als wehrpflichtiger Stabsapotheker in einem Forschungslabor der Bundeswehr.

Von Oktober 1971 bis Oktober 1973 führte ich am Max-Planck-Institut für Biochemie, München und Martinsried bei München, meine Doktorarbeit durch.

